

# 海藻および海藻多糖類の腸内菌への影響に関する研究

著者	久田 孝
学位授与機関	東京水産大学
学位授与年度	1997
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1342/00001057/">http://id.nii.ac.jp/1342/00001057/</a>

海藻および海藻多糖類の腸内菌への影響に関する研究

久田 孝

1997

## 目 次

緒 言 .....	1
第1章 腸内菌による海藻類中多糖類の <i>in vitro</i> における発酵 .....	6
第1節 ヒト糞便フローラによる海藻多糖類発酵能および発酵菌株の分離 ..	6
第2節 食用乾燥海藻製品の水溶性多糖類の検出とその発酵性 .....	19
第2章 食用海藻類のラット盲腸内フローラおよび血中脂質レベルへの影響 ..	31
第3章 海藻多糖類のラット盲腸内フローラおよび血中脂質レベルへの影響 ..	46
第1節 海藻多糖類のラット盲腸内フローラおよび血中脂質レベルへの影響 ..	46
第2節 ラミナランおよび低分子量アルギン酸ナトリウムの混餌濃度の ラット盲腸内フローラおよび血中脂質レベルに及ぼす影響 .....	55
第4章 アラメ粗抽出多糖類およびメタノール抽出物のラット盲腸内 フローラおよび血中脂質レベルに及ぼす影響 .....	63
第5章 <i>Clostridium ramosum</i> によるラミナランからの分解生成物の腸内菌 による利用 .....	73
総 括 .....	82
Summary (要 約) .....	85
文 献 .....	89
付 表 .....	96
附表1 培地および試薬類 .....	96
附表2 動物実験に関するデータ .....	97



## 緒 言

褐藻類のワカメ、コンブ、ヒジキ、モズク、アラメ、紅藻類のノリ、緑藻類のアオノリ、アオサなど、様々な大型海藻類が東アジア、東南アジア地域で古くから食されてきた<sup>1)</sup>。特に日本においては約1万年前の集落遺跡からヒジキ、アラメ、ワカメなどが発見されていることや、「古事記」や「万葉集」、また14種の海藻を貢納品に指定した「延喜式」の記録などから、先史時代、古代を通じて現在まで海藻が重要な食糧であった<sup>1-3)</sup>ことが知られている。一方、欧米諸国でも、東南アジア地域と比較するとその消費量はまだ少ないが、近年は健康指向が高まるとともに、sea vegetable (一般的に海藻は食用のものも含め、seaweeds = 海の雑草と呼ばれてきた)としてその消費量を伸ばしている<sup>4)</sup>。先進国では従来から増粘剤やヨードなど食品添加物や医薬品の工業原料として海藻が用いられてきたが、Jensen<sup>5)</sup>は世界における海藻の食品(生鮮および加工製品)としての消費量が、食品添加物用の原料も含めた工業原料としての海藻の消費量を超え、また、経済的にもそれぞれ30億米ドルおよび5.1億米ドルと食品としての海藻がはるかに大きな市場を確立していることを報告している。

海藻には陸上植物中には見られないアルギン酸や寒天、カラギーナンなどの粘稠な水溶性多糖類が多量に含有されており、ゲル化剤、増粘剤、増量剤、安定剤などとして広く食品工業的に、また胃腸粘膜保護剤などの医薬品原料としても利用されている<sup>6-8)</sup>。これらの海藻多糖類は陸上植物多糖類のセルロース、マンナン、ペクチンなどと同様に、ヒト消化管が分泌する酵素に対して難消化性<sup>9,10)</sup>であり、食物繊維と呼ばれている。また、褐藻類には貯蔵多糖類として $\beta$ -1,3結合グルカンで構成されるラミナランが含有されており、このラミナランも陸上植物の貯蔵多糖類であるデンプンとは異なり、食物繊維である<sup>1)</sup>。

食物繊維(難消化性繊維)は栄養価がほとんどないことから、かつてはヒトまたは哺乳類の健康にとって不必要であるばかりか、栄養成分の吸収を阻害する有害な成分と考えられた時期もあった<sup>10)</sup>が、1970年代に入りBurkitt<sup>12-15)</sup>やTrowell<sup>9,16,17)</sup>が疫学的研究により、難消化性繊維の有用な機能性を相次いで報告した。とくにTrowellは長年にわたるアフリカでの医療活動と、文献調査から西洋食地域とアフリカ地域における難消化性繊維の摂取量と排便頻度、排便量との正の相関、または



大腸癌の発生頻度などとの負の相関に関する多くの知見を報告した。さらに彼は1972年に「食物繊維, dietary fiber」を“ヒトの消化酵素の作用を受けない植物細胞の構造残渣”とする定義を発表し、1976年には“ヒトの消化酵素により水解されない植物の多糖類とリグニン”と修正し、その摂取の必要性を提唱した。また、Cummings *et al.*<sup>18-20)</sup> や Stephen *et al.* など多くの研究者<sup>21-23)</sup> が、ヒトや小動物に対する食物繊維の有用な機能性を実験的に証明してきた。

このような研究成果からキチンやムチンなど動物性のものも含め、現在では食物繊維は第6の栄養素として認識されるようになり、その目標摂取量は、脂肪やタンパク質などその他の摂取量によって異なるが、日本においては1日当たり20から25 g (10 g / 1,000 kcal) と設定されている<sup>11)</sup>。また現在の平均的な摂取量は、この目標摂取量に約5 g ほど不足していることが指摘され<sup>11)</sup>、1本当たり5 g 前後の食物繊維を含む清涼飲料水や健康食品などが市販され、また、いくつかの商品が特定保健用食品として申請、認可されている。

一方、腸内フローラの研究において、1970年代から、光岡らのグループによって構築された腸内の嫌気性細菌の検索技術および分類学などの発展<sup>24-26)</sup>により、健康な成人の結腸内容物および新鮮な糞便には $10^{11}$  / g もの菌数で、400以上の菌種の腸内菌が生菌として存在していることが明らかとなった。その結果、それまで腸内および新鮮糞便で優勢とされてきた腸内細菌科 Enterobacteriaceae の100から10,000倍もの菌数レベルで嫌気性菌が優勢菌として存在していることが示された。腸内フローラと宿主の関係についても、同グループ<sup>27-29)</sup>らの研究により発癌や感染症また老化に対する働きが部分的ではあるが明らかにされつつある。特に *Bifidobacterium* (ビフィズス菌) はよく知られている整腸作用の他に、宿主の免疫賦活化、発癌物質の不活性化などヒトの健康に対する有用性を持つことが示され、より健康に有用なビフィズス菌株および乳酸菌株のスクリーニング、ビフィズス活性因子の探索などが精力的に行われ<sup>30)</sup>、プロバイオティクスとして多くの健康指向型の食品や特定保健用食品、また医薬品にも利用されている<sup>31,32)</sup>。

前述の Burkitt は「高度に精製された食品を摂取する場合は未精製（あるいは半精製）食品摂取群に比べ、残渣が少ないので繊維の摂取が低下し腸内環境が変化する。この変化は腸内フローラにも影響し、胆汁酸の分解を促進する。この結果、発癌物質の生成が増加するが、繊維摂取が少ないため、糞便容量が少なくなり、排便回数の減少と腸内容物の消化管通過時間の延長を伴うことにより、発癌の危険が高

まる」とする有名な“繊維仮説”を発表し<sup>10)</sup>、食物繊維の機能性に腸内フローラが重要な役割を持つことを示唆した。また、食物繊維が胃や小腸では消化されずに大腸に到達し、大腸内に生息する腸内菌の主な炭素源となりえるという視点から、腸内菌と食物繊維の関係については多くの研究が行われ、腸内菌を介した食物繊維の有用性が報告されてきた<sup>33-36)</sup>。しかし、その研究の多くは陸上植物、農産物由来、または合成多糖類に関するものである。Salysers *et al.*<sup>37-39)</sup> および Bayliss *et al.*<sup>40)</sup> は *in vitro* において、種々の植物細胞壁多糖類が、いくつかの腸内菌株により発酵されることを報告し、その中で褐藻類中の多糖類であるアルギン酸ナトリウムおよびラミナランを *Bacteroides* の一部の菌株が発酵することを示した。しかし、これまでに腸内フローラのバランス等に対する海藻多糖類の影響などについての研究報告はまだ少なく、近年になって Michel *et al.* がその生理作用も含めレビュー<sup>41)</sup> をまとめているが一致した見解が得られていない点が多い。

食物繊維の機能性のひとつである血中コレステロールの上昇抑制効果<sup>42-44)</sup> は、食物繊維の摂取による便通改善効果や整腸作用などと同様によく知られている。また、1980年前後からは水溶性多糖類の方が難溶性多糖類よりも血中コレステロール値を抑制することが報告されている<sup>45-47)</sup>。これまでその主な作用機序として、空腸部での食餌性コレステロールの吸収阻害が指摘され、ラットを用いた実験でも、高コレステロールまたは高脂肪食を負荷した場合の血中コレステロール上昇抑制について論じられてきた<sup>48)</sup>。しかし実際、ヒトの場合は食餌性コレステロールよりもはるかに大量のコレステロールが肝臓や小腸において合成されており、例えば日本人のコレステロール平均摂取量が1日当たり約300 mg 以下であるのに対して、その合成量は1日当たり約1 g である<sup>48)</sup>。また、この合成能は摂取コレステロール量に対して負の相関が働き、健康なヒトでは血中コレステロール値を一定に保つように調節されている<sup>48)</sup>。そのため食物繊維の効果として、上記の食餌性コレステロールの吸収阻害以外に、回腸部での胆汁酸再吸収の阻害などが注目されている<sup>49)</sup>。さらに近年になって、水溶性（発酵性）多糖類から腸内フローラによって発酵生成される短鎖脂肪酸（Short-chain fatty acids, SCFAs）、特にプロピオン酸が血中脂質の低下に深く関与することが示唆され注目されている<sup>50-53)</sup> が、この点についても海藻多糖類に関する知見はまだ少ない。

本研究では、日常よく食用とされる海藻と、海藻多糖類を対象とし、これらの摂取が腸内フローラに及ぼす影響について、また腸内フローラを介した健康、特に血



中脂質への影響について明らかにすることを目的とし、まず第1章では、ヒト糞便フローラおよび代表的な腸内菌株による海藻多糖類の *in vitro* における発酵について調べ、腸内フローラへの影響の可能性を検討し、さらに22種類の海藻乾燥製品中から発酵性多糖類を粗抽出し、回収量および発酵性を比較した。第2章ではコンブ、ワカメ、ノリなど一般的に食用とされる海藻9種類について、ラット盲腸内フローラおよび血中脂質レベルに及ぼす影響を検討した。第3章では増粘剤、安定剤などとして食品に利用される海藻多糖類であるアルギン酸ナトリウム、カラギーナンおよび寒天、また褐藻類中の貯蔵多糖類であるラミナランのラット盲腸内フローラおよび血中脂質レベルに及ぼす影響を検討した。また第4章ではアラメを対象として、海藻そのもの、および海藻多糖類の摂取が盲腸内フローラおよび血中脂質レベルに及ぼす影響の違いを調べた。第5章では多糖類の発酵状態と分解菌、その他の菌群との相互関係を明らかにするために、*in vitro* における *Clostridium ramosum* によるラミナラン分解物のラミナラン発酵能を持たない他の腸内菌の発育に及ぼす影響を調べた。

本論文の一部は下記の投稿論文として発表し、残りも近く公表の予定である。

- 1) 藤井建夫, 久田 孝, 佐伯和昭, 奥積昌世: 褐藻類中水溶性多糖類のヒト腸内菌による *in vitro* での発酵. 日水誌, 58, 147-152 (1992).
- 2) 久田 孝, 藤井建夫, 佐伯和昭, 長谷川 綾, 奥積昌世: 褐藻類のラット糞便フローラに及ぼす影響. 日水誌, 58, 307-314 (1992).
- 3) T. Kuda, T. Fujii, A. Hasegawa and M. Okuzumi: Effect of degraded products of laminaran by *Clostridium ramosum* on the growth of intestinal bacteria. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 1307-1311 (1992).
- 4) 久田 孝, 小山田 晃, 藤井建夫: 低分子量アルギン酸ナトリウムのヒト糞便フローラおよび腸内環境への影響. 日水誌, 60, 85-90 (1994).
- 5) 久田 孝, 横山理雄, 藤井建夫: 粘度の異なるアルギン酸ナトリウムのラット血清脂質レベルおよび盲腸内フローラへの影響. 食科工, 44, 226-229 (1997).
- 6) T. Kuda, M. Yokoyama and T. Fujii: Effects of marine algal diets *hijiki*, *aonori* and *nori* on levels of serum lipid and cecal microflora in rats.

*Fisheries Sci.*, 63, 428-432 (1997).

- 7) 久田 孝, 後藤秀幸, 横山理雄, 藤井建夫: 食用海藻類のラット盲腸内フローラおよび血清脂質に及ぼす影響. 日水誌, 63, 928-933 (1997).
- 8) T. Kuda, M. Yokoyama, H. Goto and T. Fujii: Effects of dietary concentration of laminaran and depolymerised sodium alginate on rat cecal microflora and plasma lipids. *Fisheries Sci.*, (受理審査中).
- 9) T. Kuda, M. Yokoyama, H. Goto and T. Fujii: Fermentable dietary fiber in dried products of brown algae and their effects on cecal microflora and levels of plasma lipid in rats. *Fisheries Sci.*, (受理審査中).



## 第1章

### 腸内菌による海藻多糖類の *in vitro* における発酵

アルギン酸、カラギーナンおよび寒天は加工食品に幅広く使用されているため、食品工学および栄養学的な立場から多くの研究が行われてきた。しかし、Burkitt の“繊維仮説” (1971) により、腸内菌の代謝が宿主の健康に大きな影響を及ぼすことが示唆されていた<sup>10)</sup>にもかかわらず、海藻多糖類を含め食物繊維の初期の栄養学的研究の目的は大まかな消化率や毒性についてのもので、腸内菌による代謝、発酵についてはあまり考慮されなかった<sup>41)</sup>。1970年代後半以降、Salyers et al.<sup>37-39)</sup> および Bayliss et al.<sup>40)</sup> は *in vitro* において、いくつかの海藻多糖類について、ヒト結腸 (糞便) 由来の菌株による発酵試験を行っているが、発酵性を示した菌株が通常ヒト腸内に存在するものなのか、あるいは、どの程度の菌数で存在するのかは明らかではなく、さらに詳細な検討が必要であると考えられる。

そこで本章第1節では *in vitro* において、ヒト腸内 (糞便) フローラによる海藻 (主に褐藻類) 中の多糖類の発酵能試験と、発酵能を持つ菌株の分離と性状試験を行い、また、腸内フローラによる炭水化物からの主な代謝産物と考えられる短鎖脂肪酸 (SCFAs) についても検討した。第2節では市販乾燥製品中から腸内フローラによって発酵可能な海藻多糖類を粗抽出し、その含有量と発酵性を検討した。

#### 第1節

##### ヒト糞便フローラによる海藻多糖類発酵能および発酵菌株の分離

ヒトの腸管内酵素では分解されない難消化性多糖類、つまり食物繊維がヒトの腸内フローラに影響を与える主な要因のひとつとして、炭水化物源として腸内菌に代謝、発酵されることが考えられる<sup>54,55)</sup>。また、腸内フローラによる炭水化物からの主な発酵産物<sup>54)</sup>のひとつである短鎖脂肪酸 (SCFAs) は、腸管内壁の細胞を刺激し

て排便を促す<sup>56,57)</sup>ことや、盲腸内でのアンモニア生成の抑制、また血中の脂質濃度へも影響することが報告<sup>48-51)</sup>されている。

そこで本節ではヒト腸内の海藻多糖類分解菌の存在を確かめ、また、それらの菌数レベルを把握するため、ヒト糞便フローラおよび代表的な腸内菌株の発酵試験を行った。また、その発酵の際に生成される SCFAs についても検討した。

#### 実験材料および方法

##### ヒト糞便フローラによる海藻多糖類の発酵試験

成人男子 (23 または 30 歳) の新鮮な糞便を希釈液 A<sup>58)</sup> (以下培地、試薬液等の組成は、付表1 培地および試薬液類の項に示す。) を用い常法通りに段階希釈し、 $10^{-2}$  から  $10^{-11}$  までの各希釈段階の 1 ml を、基質多糖類としてアルギン酸ナトリウム (和光純薬)、ラミナラン (東京化成)、フコイダン (Sigma)、カラギーナン (和光純薬)、寒天 (極東製薬) または粉末セルロース (東洋ろ紙) 0.5% (w/v) を含む GAM1/4 濃度試験培地 (GAM1/4) 15 ml に接種後、ガス噴射法<sup>59)</sup> またはスチールウール法<sup>60)</sup> を用い、37℃ で3日間嫌気培養した。培養後、BTB-MR液<sup>61)</sup> を添加し、培地の赤変により pH 低下が確認されたものを発酵陽性の多糖類とした。また、アルギン酸ナトリウム、ラミナラン、フコイダンおよび粉末セルロースについて GAM 試験培地 (GAM1) を用いて同様の実験を行った。

##### 海藻多糖類発酵菌の分離

ヒト糞便フローラにより発酵された基質多糖類について、その発酵能を持つ菌株の分離を試みた。Table 1 に示した寒天平板培地を用いてヒト糞便から188株、アルギン酸ナトリウム含有培養液から247株、およびラミナラン含有培養液から262株を分離した。糞便由来菌株についてはアルギン酸およびラミナランの発酵能を、糞便培養液由来菌株についてはそれぞれの基質多糖類について発酵能を以下の方法で検討した。GAM1 で前培養した菌株を、基質 0.5% を含む GAM1/2 半流動培地に一白金耳接種し、37℃ で4日間培養した。培養後 BTB-MR 液を添加して、pH 低下の確認されたものを発酵能陽性とした。

##### 海藻多糖類発酵菌の性状検査および同定

海藻多糖類発酵能を示した分離菌株について、光岡ら<sup>62)</sup> の性状検査法および鑑



別性状表に沿って 33 項目の性状検査 (Table 2) を行い、種ないし属レベルの同定を行った。

#### 代表的なヒト腸内菌による海藻多糖類の発酵能

Table 3 に示したヒト腸内の代表的な菌株 19 種 (東京大学獣医畜産学科公衆衛生研究室保存菌株), 食中毒菌であるウェルシュ菌 *Clostridium perfringens* (東京都立衛生研究所保存菌株) および緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* (東京水産大学食品微生物学研究室保存菌株) についてアルギン酸ナトリウム, ラミナランおよびフコイダンの発酵能を以下のように検討した。GAM1 で前培養した各供試菌株の菌液 0.2 ml を 各多糖類 0.5 % 含む GAM1/4, 10 ml に摂取し, CO<sub>2</sub> でガス噴射置換し, 37 °C で 3 日間培養した。培養後, pH 電極 (堀場 6636 型) を直接培養液に差し込み pH を測定し, また培養液の濁度 (600 nm の吸光度) を測定した。

#### ヒト糞便およびラット盲腸内フローラによる海藻多糖類からの SCFAs の生成

健康なヒト (n = 3, 成人 28 および 29 歳, 幼児 15 ヶ月) の糞便を希釈液 A を用いて 50 倍希釈し, その 1 ml をラミナランまたはアルギン酸ナトリウム (AG5: 分子量 50,000 ± 10,000, 共成製薬, ソルギン<sup>TM</sup>)<sup>63)</sup> 2 % を含む GAM1/4, 10 ml に摂取した。スチールウール法を用いて 37 °C で嫌気培養し, 24 h 後, 培養液の pH, 濁度, アンモニア濃度および SCFAs を測定した。

4 から 5 週齢の Wistar 系雄ラット (日本クレア) 3 匹の盲腸内容物を上記と同様に各多糖類 2 % を含む GAM1/2 3 本ずつに接種し嫌気培養し, 24, 48 および 96 h 後に培養液の pH を調べた。また, 24 および 96 h 後の培養液の濁度, アンモニア濃度および SCFAs を測定した。

#### 海藻多糖類発酵菌による海藻多糖類からの SCFAs の生成

前節のヒトの代表的な腸内菌株を用いた実験で, ラミナランまたはアルギン酸ナトリウム発酵能を示した菌株による SCFAs の生成を検討した。前培養した培養液の 0.4 ml を 1 % のラミナランまたはアルギン酸を含む 2 種類の GAM1/2 に接種し, 24 h 後の培養液の pH および培養液中の SCFAs (乳酸, 酢酸, プロピオン酸および n-酪酸) を測定した。

#### 化学分析

培養液を 2,220 × g, 15 min で遠心分離 (日立 CT4D 型) した後, 上清をアンモニアおよび SCFAs 測定に供した。アンモニア濃度は測定キット (アンモニア-

テストワコー, 和光純薬) を用いて測定した。SCFAs はカルボン酸ラベル化試薬 (YMC) を用いてラベル化した後, 以下の条件で HPLC で分析した。カラム: YMC-Pack FA. カラム温度: 50 °C. 移動相: アセトニトリル / メタノール / 水 (30 / 16 / 54, v / v / v) pH 4 ~ 5 (0.01 N 塩酸で調製), 流速: 1.2 ml / min. 検出波長: 400 nm. この分析で内部標準 (クロトン酸), 標準, 移動相には全て和光純薬の HPLC 用試薬もしくは特級試薬を用いた。

#### 統計処理

本研究において統計処理を行う場合, 数値は平均値 ± 標準偏差 (SD) または標準誤差 (SE) で表わした。各試験群と対照群間の平均値の差は t-検定<sup>64)</sup>を行い, 危険率 0.05 以下を有意差ありとした。

## 結 果

#### 糞便フローラにより発酵可能な海藻多糖類

上に示した 6 種類の海藻多糖類 0.5 % を含む液体培地に糞便希釈液を接種し, 3 日間培養した結果を Table 4 に示した。フコイダンを基質とした培地では 10<sup>-8</sup> 希釈段階までしか発育しなかったが, その他の各試験培地での結果より, 細菌が 10<sup>10</sup> / g 糞便中に存在することが示された。アルギン酸を基質とした場合, GAM1 ではどの希釈段階でも pH の変化は認められなかったが, GAM1/4 では 10<sup>-2</sup> から 10<sup>-8</sup> 希釈段階において pH の弱い低下がみられた。ラミナランを基質とした場合, GAM1 では 10<sup>-9</sup> 希釈段階のみに pH の低下が明確にみられ, GAM1/4 では 10<sup>-2</sup> から 10<sup>-9</sup> 希釈段階まで pH の低下が明確にみられた。この場合 10<sup>-9</sup> 希釈段階で特に pH の低下が著しかった。フコイダン, セルロース, カラギーナンおよび寒天の発酵は認められなかった。

#### 多糖類発酵能陽性菌株の分離と性状試験

Table 1 に示した糞便由来菌 188 株およびアルギン酸含有培養液から分離した 247 株についてアルギン酸発酵能を調べた結果, Table 2 の I, II 群に該当する 3 株が陽性を示した。これらの菌株の性状試験の結果は *Bacteroides ovatus* の性状と一致していた。また糞便由来菌 188 株およびラミナラン含有培養液から分離した 262 株についてラミナラン発酵能を調べた結果, 10 株が陽性を示した。これらの菌



株のうち3株 (Table 4 の III 群) の性状試験の結果は *Bacteroides ovatus* と一致していた。V, VI および VII 群は嫌気性で芽胞を形成し *Clostridium* 属であり、また IV 群は明確な芽胞が認められなかったが、その他の性状試験の結果は V 群と一致していた。

#### 代表的なヒト腸内菌による海藻多糖類の発酵

代表的なヒト腸内菌株による海藻多糖類の発酵能試験の結果を Table 3 に示した。*Bacteroides ovatus* および *Clostridium ramosum* にラミナラン発酵能が、*B. ovatus* にアルギン酸ナトリウム発酵能が認められた。ラミナランの発酵性は *C. ramosum* により *B. ovatus* より強く示された。

#### ヒト糞便フローラによるラミナランおよびアルギン酸からの SCFAs の生成

上記の実験でヒト糞便フローラによって発酵が示されたラミナランおよびアルギン酸ナトリウムについて、再度発酵試験を行い培養液の pH、濁度、アンモニア濃度および SCFAs 濃度を調べた結果を Table 5 および 6 に示した。ラミナランは全ての糞便検体 (n = 3) で資化され、培養液の濁度が増加し、乳酸の生成が著しく、pH は約 4.5 まで低下したが、プロピオン酸は抑制される傾向を示した。一方、3 検体中、幼児の糞便 1 検体がアルギン酸を発酵できなかったが、成人糞便の場合、培養液の pH が 0.3 ~ 0.4 程度低下し、培養液中には酢酸が大量に、また、わずかながらプロピオン酸の生成が増加した。アンモニアの生成はラミナランにより著しく抑制され、それぞれ基質を含まない対照培養液の約半分の濃度であった。また、アルギン酸が発酵された場合にもわずかであるがアンモニア濃度は抑制された。

#### ラット盲腸内フローラによるラミナランおよびアルギン酸からの SCFAs の生成

ラット盲腸内容物培養液の pH、濁度、培養液中のアンモニア濃度および培養液中の SCFAs 濃度を Table 7 および 8 に示した。培養 24 h ではラミナランの存在により濁度が増加し、酢酸の生成がみられたが、乳酸の顕著な生成は認められず、pH は 5.3 程度 (対照の pH は 5.8) であった。96 h 培養後は著しい乳酸の生成が認められ pH も約 4.3 まで低下した。対照と比べプロピオン酸濃度は 24 h で高値を示したが、96 h では低値であり、*n*-酪酸は 96 h で低値であった。アルギン酸ナトリウムの存在による培養液 pH の低下は 24 および 48 h 培養では観察されず、培養 96 h 後で pH の低下、酢酸濃度の増加が認められ、またプロピオン酸もわずかながら増加の傾向を示した。

#### 海藻多糖類発酵菌株による SCFAs の生成

上記実験においてラミナラン発酵能を示した *C. ramosum*、およびラミナランおよびアルギン酸発酵能を示した *B. ovatus* の各培養液中の SCFAs 濃度を Table 9 に示した。*C. ramosum* はラミナランから主に乳酸を生成した。*B. ovatus* は測定項目の SCFAs に大きな変動はなかった。ラミナランおよびアルギン酸によりコハク酸とほぼ同位置のピークが増加していたが、今回の HPLC 条件では単一のピークとしては分離されなかった。ラミナランにより *C. ramosum* ほどは顕著ではないが乳酸および酢酸の増加が示された。

#### 考 察

今回の実験で糞便 1 g 中にアルギン酸ナトリウムを発酵する菌群が  $10^8$  レベル存在し、総生菌数のおよそ 1 / 100 レベルを占めることが示された。これは腸内細菌科 Enterobacteriaceae 菌数と同レベル<sup>24-26)</sup> (Table 1) かそれ以上の菌数である。アルギン酸ナトリウム発酵能を有する細菌として分離した 3 株は性状試験の結果より、*Bacteroides ovatus* と推定され、またヒトの代表的な腸内菌株による試験でも *B. ovatus* に発酵能がみられ、この菌株はアルギン酸の存在により発酵が促進された (Table 2)。*B. ovatus* のアルギン酸発酵能は Salyers et al.<sup>37)</sup> によってすでに報告されている。*B. ovatus* は健康人から普通に分離される菌種ではあるが<sup>55)</sup>、*B. vulgatus* などと比較するとその菌数や検出率は低いことが報告されており<sup>65)</sup>、アルギン酸の発酵能を有する菌群は総菌数の約 1 / 100 であることを示した上の結果と一致している。一方、ラミナランを発酵する菌群は糞便中に  $10^9$  / g と、アルギン酸ナトリウム発酵菌より高濃度で存在することが示された (Table 4)。今回の実験では他の希釈段階に比べ  $10^{-9}$  希釈段階で強い陽性を示したが、これはアンモニアなどアルカリ性の腐敗物質を生成する大腸菌群などが  $10^9$  / g 以上は存在せず、 $10^{-9}$  希釈段階ではこれらの菌群の影響を受けなかったためと推察される。

本実験ではフコイダン、カラギーナン、寒天およびセルロースの発酵能はみられなかったことから、実際に *in vivo* で摂取された場合も腸内での分解作用も大きくないと予想される。

ラミナラン発酵能を有する細菌として分離された 10 株は、性状試験の結果より



Table 2 のグループ III の 3 株が *B. ovatus* と推定された。グループ IV に分類した 3 株は芽胞形成が認められず、菌形態も *Bifidobacterium* 属と似ていたが、グループ V の 2 菌株が芽胞形成しにくいというに、芽胞形成以外は性状試験結果が両グループで全て一致しており、また鑑別性状表<sup>62)</sup>とも一致していることから、両グループとも *Clostridium thermohydrosulfuricum* と類似した菌種であると考えられた。グループ VI は *C. beijerinckii* に、グループ VII は *C. clostridiforme* に類似していた。また、ヒトの代表的な腸内菌による試験では *B. ovatus* および *C. ramosum* に発酵能がみられた。特に *C. ramosum* は培地中の pH を初期値 6.6 から 12 h で 4.7 まで低下させ、強い発酵能を示した。これらの *C. ramosum*, *C. clostridiforme* などの菌種は西洋食よりも日本食を摂取している場合に高濃度で検出されたという報告例<sup>35,66)</sup>もあり、海藻類を含め食物繊維の摂取量との関連も推察される。

ヒト糞便を培養した場合、24 h 培養後にラミナランから主に乳酸の生成と著しい pH の低下が認められた (Table 5, 6) 。 Michel et al.<sup>67)</sup> もヒト糞便フローラによるラミナランおよびアルギン酸ナトリウムの *in vitro* における発酵を検討しているが、ラミナランは 24 h 培養で 90 % 以上代謝され、多量の酪酸が生成されることを報告しており、本実験の結果とは異なっている。食生活やストレス等で腸内フローラは大きく変動することが知られている<sup>35,39,65)</sup> ため、それぞれの実験で用いた糞便中の菌群あるいは菌種レベルの違いにより生成される SCFAs の組成が異なると考えられる。

アルギン酸は成人糞便フローラにより酢酸およびわずかながらプロピオン酸に代謝されたが、近年、これらの有機酸の生成は、水溶性食物繊維の持つ抗腫瘍性<sup>68-70)</sup> や血中コレステロールの上昇抑制<sup>52-55)</sup> などに深く関与することが示唆され注目されている。一方、幼児糞便フローラではアルギン酸発酵能が認められなかった。ヒト腸内菌の全ての菌種、亜種について調べられたわけではなく *Bacteroides ovatus* でも菌株によりアルギン酸を資化できないものもある<sup>37)</sup> が、標準菌株を用いた本実験の結果 (Table 3) や Salyers et al.<sup>37,38)</sup> の報告からヒト腸内でアルギン酸を資化する主な細菌は *B. ovatus* である可能性が高い。光岡らのグループの研究により乳児糞便フローラは *Bifidobacterium* が最優勢で、離乳とともに成人の様な複雑な糞便フローラへ変動することが示されている<sup>71,72)</sup> 。 *B. ovatus* やその他のアルギン酸分解菌も離乳とともに、菌数や検出率が増加すると考えられる。

ラット盲腸内容物を培養した場合 (Table 7, 8) , 24 h 後ではラミナランにより

pH の低下が認められたが、酢酸がわずかに増加しただけで、96 h 後では乳酸の生成が認められた。また、アルギン酸ナトリウムからは 96 h で酢酸の生成が認められたが、pH の低下はわずかであった。今回の実験条件ではラット盲腸内容物はヒト糞便よりかなり多糖類発酵能が弱いことが示されたが、この結果はラット盲腸内菌には酸素に対して極めて感受性の大きい菌種 (extremely oxygen sensitive, EOS) が多い<sup>73)</sup> ことや、*in vitro* における至適培養条件が菌種間で異なることに起因することも考えられるため、一概にラット腸内菌による代謝が、ヒトの場合よりも弱いとは断定できない。しかし、今回用いたラットでもヒトと同様に腸内にはアルギン酸やラミナランを分解、発酵する菌種が確実に存在し、その摂取の腸内フローラ、または腸内環境に及ぼす影響をラットを用いて検討することが可能であることが示された。

培養液中にラミナランが存在した場合、ヒト糞便およびラット盲腸内容物培養液中のアンモニア生成量が抑制された。腸内フローラによるアンモニアの生成が SCFAs の生成によって抑制されること<sup>74)</sup> はよく知られており、アンモニア血症や肝性昏睡などの治療薬として腸内発酵性の強いラクツロース<sup>75)</sup> などが用いられている。ヒト腸内菌でラミナラン分解菌である *C. ramosum* および *B. ovatus* 菌株を用いた実験において、*C. ramosum* 培養液の SCFAs 組成はヒト糞便培養液およびラット盲腸内容物 96 h 培養液の SCFAs 組成と類似し、一方、*B. ovatus* の SCFAs 組成はラット盲腸内容物 24 h 培養液の SCFAs 組成と類似していた (Table 9) 。 *B. ovatus* の実験結果から、各培養液の pH の低下にはコハク酸あるいは測定項目以外の有機酸も関与していることが示されたが、今回の HPLC 条件では夾雑物のピークと重なる場合が多く、詳細な検討はできなかった。

これまで多くの研究者により、食餌中の食物繊維量の差異による腸内フローラの変動について研究されている<sup>33-36,65,66)</sup> が、その明確な変動を示した例は一部である。しかし本実験の結果から、海藻類中の水溶性多糖類のうちラミナランおよびアルギン酸ナトリウムは *Bacteroides* や *Clostridium* などによって分解され、生成される短酸脂肪酸やオリゴ糖などの低分子化合物はこれらの菌群だけではなくその他の菌群にも利用され、腸内フローラ全体に、さらには宿主の健康にも影響する可能性が示唆された。実際に *in vivo* での影響を検討するため、第 2 章から第 4 章ではラットを用いた実験を行った。ラミナランおよびアルギン酸は、褐藻類の特異的な多糖類とされ通常はコンブ、ワカメ、アラメなどを食することによって摂取される (ア



ルギン酸は食品工業的に利用されているため加工食品から少量摂取される)。しかし、その海藻の種類により含有量や発酵性が異なることが考えられ、褐藻類の中でも腸内フローラおよび宿主の健康に及ぼす影響はある程度異なってくると考えられる。次節では市販の海藻製品 22 種類からのこれら発酵性多糖類を粗抽出し、その含有量と発酵性を検討した。

**Table 1** Numbers of strains isolated from human feces for polysaccharides fermentation test

Source	Group	Media	Log no. of viable counts / g or ml	No. of isolates	No. of fermentable/tested strains	
					Na-alginate	Laminaran
<b>Anaerobic incubation</b>						
Human feces	G	GAM agar	9.9	19	0/19	0/19
	GB	GAM + BS solution	8.8	18	0/18	2/18
	GE	GAM + ES solution	8.3	20	0/20	0/20
	GC	GAM + Clostrisel	9.0	19	0/19	5/19
	B	Bacteroides agar	9.8	19	1/19	0/19
	F	FM agar	6.4	18	0/18	0/18
	L	LBS agar	8.6	15	0/15	0/15
<b>Aerobic incubation</b>						
	GA	GAM agar	8.1	20	0/20	0/20
	D	DHL agar	8.1	20	0/20	0/20
	P	PEA agar	7.3	20	0/20	0/20
<b>Total</b>				<b>188</b>	<b>1/188</b>	<b>7/188</b>
<b>Anaerobic incubation</b>						
Human feces incubated with Na-alginate*	G	GAM agar	9.0	4	0/4	
	GB	GAM + BS solution	6.2	38	2/38	
	GE	GAM + ES solution	8.1	40	0/40	
	GC	GAM + Clostrisel	8.8	20	0/29	
	B	Bacteroides agar	8.7	22	0/22	
	F	FM agar	4.5	5	0/5	
	L	LBS agar	5.9	39	0/39	
<b>Aerobic incubation</b>						
	GA	GAM agar	8.6	40	0/40	
	D	DHL agar	7.9	19	0/19	
	P	PEA agar	8.3	20	0/20	
<b>Total</b>				<b>247</b>	<b>2/247</b>	
<b>Anaerobic incubation</b>						
Human feces incubated with laminaran*	G	GAM agar	8.2	12		0/12
	GB	GAM + BS solution	5.8	37		2/37
	GE	GAM + ES solution	6.3	39		0/39
	GC	GAM + Clostrisel	6.3	23		1/23
	B	Bacteroides agar	5.5	26		0/26
	F	FM agar	4.5	6		0/6
	L	LBS agar	5.1	40		0/40
<b>Aerobic incubation</b>						
	GA	GAM agar	7.4	40		0/40
	D	DHL agar	7.6	20		0/19
	P	PEA agar	7.4	19		0/20
<b>Total</b>				<b>262</b>		<b>3/262</b>
<b>Total</b>				<b>697</b>	<b>3/435</b>	<b>10/450</b>

\* Incubation in GAM1/4 with 0.5 % sodium alginate or laminaran under atmosphere of 100 % CO<sub>2</sub> for 96 h at 37 °C.

**Table 2** Characteristics of polysaccharide-fermentable bacteria isolated from human feces

	Group	I	II	III	IV	V	VI	VII
Gram stain								
Spore formation		—	—	—	+	±	±	+
Nitrate reduction		—	—	—	—	±	+	±
Indole production		—	—	—	—	—	—	—
H <sub>2</sub> S production		—	—	—	—	—	—	—
Acid from		+	+	—	—	—	—	—
Na-alginate								
Laminaran		+	+	+	—	—	—	—
Arabinose		—	—	+	+	+	+	+
Xylose		+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose		+	+	+	+	+	+	+
Ribose		+	—	+	—	—	—	—
Glucose		w	—	+	+	+	+	+
Mannose		+	+	+	+	+	+	+
Fructose		+	—	+	+	+	+	—
Galactose		+	+	+	+	+	+	+
Sucrose		+	+	+	+	+	+	+
Maltose		+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose		+	+	w	+	+	+	w
Lactose		+	+	w	+	+	+	w
Trehalose		+	+	+	+	+	+	+
Melibiose		—	—	—	+	+	—	—
Melezitose		+	+	+	+	+	+	+
Starch		w	—	+	—	—	—	—
Glycogen		+	+	+	+	+	+	+
Glycerol		w	+	+	+	+	+	+
Mannitol		—	—	—	—	—	—	—
Sorbitol		w	+	+	+	+	—	—
Inositol		+	+	+	+	+	+	—
Escline		—	—	—	—	—	—	—
Salicin		—	—	+	+	+	—	—
Amygdalin		+	+	w	+	+	+	w
Starch hydrolysis		+	+	w	+	+	+	—
Escline hydrolysis		—	—	—	—	—	—	—
		+	+	+	+	+	+	+
No. of isolates B*1		1						
GB				2				
GC			1	1	2		1	
GB-A	1	1						
GB-L			2					
GC-L						1		

\*1 See Table 1.

I~III; may be *Bacteroides ovatus*. IV~V; *Clostridium* spp.



**Table 3** Utilization of algal polysaccharides by human intestinal bacteria

Microorganisms	Na-alginate		Laminaran		Fucoidan	
	pH	Growth	pH	Growth	pH	Growth
<i>Bacteroides ovatus</i> HAN 5	++	++	+	+	-	-
<i>B. vulgatus</i> HAN 9	-	-	-	w	-	-
<i>B. distasonis</i> HAN 15	-	-	-	w	-	-
<i>B. fragilis</i> HAN 18	-	-	-	-	-	-
<i>Megamonas hypermegas</i> HAN 25	-	w	-	w	-	-
<i>Eubacterium aerofaciens</i> ATCC25986	-	-	-	-	-	-
<i>E. ventriosum</i> HAN 43	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium clostridioforme</i> HAN 66	-	-	-	-	-	-
<i>C. innocuum</i> HAN 69	-	-	-	-	-	-
<i>C. ramosum</i> ATCC25582	-	-	++	++	-	-
<i>C. perfringens</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium bifidum</i> HSD 1	-	-	-	-	-	-
<i>B. infantis</i> HSD 2	-	-	-	-	-	-
<i>B. breve</i> HSD 3	-	-	-	-	-	-
<i>B. adolescentis</i> HSD 4	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> HSD 5	-	-	-	-	-	-
<i>Peptostreptococcus productus</i> ATCC27340	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> HAE 1	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> HSR 1	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> HSR 2	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-

Symbols: ++; strongly positive (lower pH or growth promotion), +; positive, w; weakly positive, -; negative.

**Table 4** Fermentation of algal polysaccharides by human fecal microflora

Dilution levels	Substrates and basal media									
	Na-alginate		Laminaran		Fucoidan		Carrageenan		Agar	
	GAM	1 1/4	1 1/4	1 1/4	1 1/4	1 1/4	1/4	1/4	1 1/4	1 1/4
-2	-	w	-	+	-	-	-	-	-	-
-3	-	w	-	+	-	-	-	-	-	-
-4	-	w	-	+	-	-	-	-	-	-
-5	-	w	-	+	-	-	-	-	-	-
-6	-	w	-	+	-	-	-	-	-	-
-7	-	w	-	+	-	-	-	-	-	-
-8	-	w	-	+	-	-	-	-	-	-
-9	-	-	+	++	NG	NG	-	-	-	-
-10	-	-	-	-	NG	NG	-	-	-	-
-11	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NT	NT	NG	NG

+: positive, -: negative(growth positive), w; weakly positive, NG; no growth, NT; not tested.

**Table 5** Effects of laminaran and alginate on growth (O.D.), pH and ammonia in human fecal culture

		Substrates (2%)		
		Sample *1	Control	Laminaran Alginate *2
Growth (O.D.)	1		1.87	3.15 2.91
	2		1.94	2.98 3.26
	3		1.83	3.07 1.87
pH	1		6.03	4.31 5.67
	2		6.12	4.49 5.72
	3		5.81	4.61 5.79
Ammonia ( $\mu$ g/ml)	1		172	97 155
	2		223	96 168
	3		171	131 184

Human feces were incubated with or without polysaccharides using steel wool method at 37°C for 24h.

\*1 Two adults(1 and 2) and one infant(3) feces.

\*2 Depolymerised low viscous(1.5cp at 1% solution) sodium alginate (AG5).

**Table 6** Effects of laminaran and alginate on short-chain fatty acids (SCFAs) in human fecal culture

		Substrates (2%)		
		Sample	Control	Laminaran Alginate
Lactic acid (mg/ml)	1		t *	1.98 0.37
	2		t	2.07 t
	3		0.26	1.73 0.34
Acetic acid (mg/ml)	1		0.94	1.48 1.66
	2		1.36	1.28 2.23
	3		0.69	1.01 0.59
Propionic acid (mg/ml)	1		0.70	0.51 0.80
	2		0.79	0.61 0.93
	3		0.44	0.46 0.34
n-Butyric acid (mg/ml)	1		0.50	0.49 0.48
	2		0.38	0.25 0.42
	3		0.03	0.07 t

See footnotes of Table 5.

\* t; trace.



**Table 7** Effects of laminaran and alginate on growth (O.D.), pH and ammonia in the culture of rat cecal content

	Incubation time	Substrates (2%)		
		Control	Laminaran	Alginate
Growth (O.D.)	24 h	0.74±0.04	1.21±0.07 <sup>b</sup>	0.77±0.03
	96 h	1.74±0.01	3.01±0.04 <sup>b</sup>	1.78±0.04
pH	24 h	5.77±0.04	5.26±0.10 <sup>b</sup>	5.80±0.03
	48 h	5.95±0.01	4.84±0.15 <sup>b</sup>	5.98±0.02
	96 h	5.96±0.02	4.42±0.14 <sup>b</sup>	5.88±0.03
Ammonia (μg/ml)	24 h	172±21	120±10 <sup>a</sup>	186±10
	96 h	1687±118	800±141 <sup>b</sup>	1528±128

See footnote of Table 5. Values are mean±SD of three rats.  
Significant difference from control, <sup>a</sup>  $p < 0.05$ , <sup>b</sup>  $p < 0.01$ .

**Table 8** Effects of laminaran and alginate on SCFAs in the culture of rat cecal contents

	Incubation time	Substrates (2%)		
		Control	Laminaran	Alginate
Lactic acid (mg/ml)	24 h	0.17±0.02	0.13±0.11	0.07±0.07
	96 h	0.06±0.01	1.57±0.47 <sup>b</sup>	0.07±0.02
Acetic acid (mg/ml)	24 h	1.06±0.06	1.42±0.04	1.05±0.04
	96 h	2.30±0.13	2.07±0.15 <sup>a</sup>	2.77±0.16 <sup>a</sup>
Propionic acid (mg/ml)	24 h	0.30±0.02	0.46±0.08 <sup>a</sup>	0.32±0.03
	96 h	1.05±0.05	0.29±0.09 <sup>b</sup>	1.19±0.07
<i>n</i> -Butyric acid (mg/ml)	24 h	0.15±0.01	0.13±0.01	0.14±0.01
	96 h	0.29±0.03	0.09±0.05 <sup>a</sup>	0.34±0.04

See footnotes of Tables 5 and 7.

**Table 9** SCFAs from laminaran or alginate by strains of human intestinal bacteria

	<i>Clostridium ramosum</i>		<i>Bacteroides ovatus</i>		
	Control	Laminaran	Control	Laminaran	Alginate
Lactic acid(mg/ml)	0.58	2.17	0.18	0.51	0.42
Acetic acid(mg/ml)	0.25	0.51	0.28	0.35	0.29
Propionic acid(mg/ml)	t	t	0.30	0.22	0.30
<i>n</i> -Butyric acid(mg/ml)	0.08	0.09	0.10	0.09	0.10

The strains were incubated 37°C for 24 hr in GAM1/2 with or without 2% laminaran.

## 第2節

### 食用乾燥海藻製品の水溶性多糖類の検出とその発酵性

前節の実験で褐藻類中の多糖類であるアルギン酸ナトリウムおよびラミナランがヒトおよびラット腸内フローラにより発酵されることが示された。季節によってその含有量は異なるがアルギン酸はコンブ、ワカメ、ヒジキなどのほとんどの褐藻類で、乾燥重量当たり 10 から 50 % も含まれることが知られている<sup>76,77)</sup>。一方、ヒト糞便フローラおよびラット盲腸内フローラによりアルギン酸より強く発酵され、腸内環境に強い影響を与えると推察されるラミナランは、アラメ *Eisenia bicyclis* やコンブ属の *Laminaria digitata*, *L. hyperborea* などから乾燥重量の約 15 ~ 20 % もの収率で抽出される<sup>78)</sup>ことが報告されている。しかし、ラミナランは細胞内に貯蔵多糖類として存在する物質で、季節変動が大きいことと、粘性が低く水に容易に溶け出すことから、一般的に料理に用いられる乾燥製品中にどの程度含有されているかは明らかでないものがほとんどである。そこで本章では食用とされ、小売店で販売されている乾燥海藻（褐藻）製品 22 種類を対象として、発酵性多糖類、特にラミナランの存在とその腸内菌による発酵性について検討した。

### 実験材料および方法

#### 乾燥海藻製品

本実験に用いた乾燥海藻製品 22 種類は全て小売店（中規模大型店舗、スーパー等）より購入した。製品名のローマ字、日本語表記による表示、また明らかな場合はその和名および学名<sup>79)</sup>を Table 10 に示した。また、主な収穫地域を Fig. 1 に示した。

#### 多糖類の分画

乾燥製品を 5 mm × 5 mm 角程度に切断後、粉碎器（柴田, SCM-40A）で粉碎し、Black *et al.*<sup>78,80)</sup> および Haug *et al.*<sup>81,82)</sup> の方法を改変した Fig. 2 に示す分画法に沿って処理した。メタノールに不溶性で 0.1 N 塩酸中に 2 h で抽出され、75 % エタノール中で沈殿する希塩酸抽出画分を分画 1 (fraction 1 : F1) とした。希塩酸



抽出後の残渣を1%炭酸ナトリウムで1晩抽出し、66%エタノール中で沈殿するアルカリ抽出画分を分画2 (F2) とした。希塩酸にもアルカリにも不溶性の残渣を分画3 (F3) とした。それぞれの抽出画分はエーテルで洗浄後、40℃で一晩乾燥させ、回収率を計算した。なおラミナランおよびフコイダンは希塩酸によって、アルギン酸は炭酸ナトリウム溶液によって効率よく抽出される<sup>78,82)</sup> ことが報告されている。多糖類抽出の至適条件は各海藻によって異なることも考えられるが、本実験においては含有量はおおよそその検討であり、さらに粗抽出した多糖類の発酵試験を行うため、総ての乾燥製品について同じ条件で粗抽出を行った。

#### 希塩酸画分中のラミナランの検出

F1 中のラミナランの検出を、前章の実験でアルギン酸の発酵性はなく、ラミナランを強く発酵した *Clostridium ramosum* ATCC25582 を用いたバイオアッセイ法、および薄層クロマトグラフィー (TLC)<sup>83)</sup> により試みた。各海藻から抽出した F1 を 0.5% 含む 2 ml の GAM1/4 を調製し、GAM1 で 24 h 前培養した *C. ramosum* を 0.1 ml ずつ接種した。37℃で 24 h 嫌気培養後、各培養液の pH を測定した。標準としてラミナランを 0~0.8% を含む GAM1/4 を用い、培養後の pH 値とラミナラン濃度に対する標準曲線を作成し、各 F1 を含む培養液の pH からおおよそのラミナラン含有量を検討した。

上の実験で乾燥製品重量の 5% 以上の回収率のあった F1、もしくはラミナランの存在が確認された F1 について、それぞれ 20 μg の試料に 2 N 硫酸 1 ml を加え、95℃で 2 h 加熱後、2 N NaOH を 1 ml 加え中和した。この試料をアルミナ TLC プレート (Aluminiumoxid<sup>TM</sup> 60 F<sub>254</sub>, Merck) に 5 μl ずつ 5 mm の帯状に置き、2-プロパノール-アセトン-0.1 M 乳酸 (2:2:1) を用いて距離 8 cm を 3 回重複展開した。展開後、ジフェニルアミン-アニリン-リン酸試薬<sup>83)</sup> に浸し、100℃、5 min 加熱後の発色バンドを検出した。対照の多糖類としてラミナランおよび低分子量アルギン酸ナトリウム (AG5) を、加水分解物の対照としてグルコース、フコース、ガラクトース、マンノースおよびキシロースを用いた。また、これらの F1 についてタンパク質量を Bradford 法<sup>84)</sup> (595nm) によりウシ血清アルブミン (BSA: 和光純薬) を標準として、および全糖量をフェノール-硫酸法 (490nm)<sup>83)</sup> によりラミナランを標準として測定した。

#### ヒト糞便フローラによる希塩酸画分およびアラメ各画分の発酵

上記のラミナランの検出の実験に供した各海藻の F1 画分、およびアラメの各画分をそれぞれ 1% 含む培地からの、ヒト (成人 30 歳) 糞便フローラによる SCFAs の生成を、前節と同様に検討した。

## 結 果

#### 乾燥海藻製品からの希塩酸抽出、アルカリ抽出および不溶性画分の回収率

22 種類の乾燥海藻製品から Fig. 2 に従って抽出した希塩酸 (F1)、アルカリ (F2) および不溶性 (F3) 画分の回収率を Fig. 3 に示した。F1 は各製品重量の 1.0~22% の範囲で回収され、ヒジキ類、アラメ、素干しメカブおよびツルモでは 9% 以上の収率であったが、コンブ類、ワカメ類およびカジメでは 4% 以下であった。F2 は約 10~60% の範囲で回収された。F3 は 5% 以下~約 50% の範囲で回収されたが、根コンブ類およびメカブ類で特に収率が低かった。

#### 希塩酸画分中のラミナランの検出

*C. ramosum* 24 h 培養液の濁度および pH に対する 0~0.8% のラミナランの存在の影響を Fig. 4 に示した。約 0.4% まで濃度依存的に発酵 (濁度の増加) および発酵 (pH の低下) を促進し、濁度と pH の低下は良く相関していた。ラミナランによる pH 低下の曲線を標準曲線とし、ラミナランの発酵性を 1.0 とした場合に、0.1 以上の発酵性 (FA: fermentation activity) を示す F1 を検出した (Fig. 5)。22 種類の製品のうち、ラミナランが検出されたのはヒダカコンブ (ミツイシコンブ *Laminaria angustata*)、ヒダカ根コンブおよびアラメの 3 種類のみであった。F1 の収率 (%) と FA を乗じた値、つまり理論的なラミナランの濃度はそれぞれ 0.6、4.0 および 10.9% であった。

F1 の収率の比較的大きかった 5 種類の海藻、および収率は大きくないがバイオアッセイでラミナランが検出されたヒダカコンブおよびヒダカ根コンブからの F1 について、TLC を行った結果を Fig. 6 および Table 11 に示した。加水分解後のラミナランはグルコースの位置のみにバンドが存在し、アルギン酸ナトリウム (ウロン酸) はほとんど起線から移動しなかった。ヒダカコンブ、ヒダカ根コンブおよびアラメにグルコースのバンドが認められた。ヒジキ類にはアルギン酸の明確なバン



ドが認められ、その他の F1 ではその痕跡が認められた。ガラクトースの位置のバンドがホシメカブのみで明確に、アラメ、ツルモ以外でその痕跡が認められた。フコースの位置のバンドがホシメカブで明確に、アラメとツルモ以外でその痕跡が認められた。ツルモではフコースよりわずかに高い Rf 値の位置のバンドが認められた。

各 F1 成分のフェノール硫酸法で測定した全糖量を Fig. 7 に示した。全糖含量はラミナラン換算で F1 中に 22 ~ 57 % の幅があり、ヒジキ類では少なく 30 % 以下であった。アルギン酸ナトリウムの発色（吸光度）はラミナランの約 20 % であった。なお、データは示さないが Bradford 法により測定した、各 F1 中のタンパク質量は 0.2 % 以下であり、ほとんど検出されなかった。

#### ヒト糞便フローラによる希塩酸画分の発酵

各製品うち *C. ramosum* により発酵された 3 種類、および比較的収率の大きかった 5 種類の海藻の F1 についてヒト糞便による発酵性試験を行った結果を Table 12 に示した。対照と比較してラミナランが検出された 3 種類の製品の F1 により乳酸および *n*-酪酸が増加していた。酢酸はメヒジキ以外で増加しており、プロピオン酸はヒダカ根コンブ、メヒジキ以外で増加していた。pH はラミナランが検出されなかった F1 でもわずかに低く、低い値であった。

#### ヒト糞便フローラによるアラメ成分からの発酵

ヒト糞便フローラによるアラメ成分からの SCFAs の生成を Table 13 に示した。アラメ粉末では pH の低下が認められたが SCFAs の増加は認められなかった。F1 および F2 ではそれぞれラミナランおよびアルギン酸ナトリウムと同様の SCFAs 組成であり、pH の低下が認められた。F3 ではアルギン酸ナトリウムと同様の SCFAs 組成を示したが、pH の低下は認められなかった。

## 考 察

今回用いたラミナランのバイオアッセイによる検出法はその再現性や測定可能な濃度、また分子量の違いやマンニトールの存在による発酵性の違いなど、まだ検討すべき点が多くあるが、数種の海藻多糖類が混在する試料中のラミナランの検出には有用な方法であると考えられる。

実験に供した 22 種類の乾燥海藻製品中、ラミナランは 3 製品から検出され、含有量はアラメで最も多く 10 % 以上含有されており、従来の報告<sup>78)</sup>と一致していた。他の 2 種はヒダカコンブ（和名ミツイシコンブ）およびヒダカ根コンブで、根コンブのほうが含有量が大きく、また、抽出した F1 の発酵性は標品のラミナラン（アラメ由来）と同等で最も強かった。同じコンブ属 *Laminaria* であるその他のコンブ製品や、アラメと類縁であるカジメ *Ecklonia cava*<sup>79)</sup> にもラミナランは検出されなかった。ラミナランは高等植物ではデンプンに相当する貯蔵多糖類であり、季節によって大きく変動し、盛夏に最も含有量が大きいとされている<sup>78)</sup>が、一般的にワカメ、ヒジキ類の収穫期は春で、コンブ、アラメ、カジメ類の収穫期は盛夏である<sup>3)</sup>。今回用いた乾燥製品は、原料海藻はその種類によってほぼ決まった季節に収穫されているため、それぞれの製品中のラミナラン含有量がロット等により大きく変動するとは考えにくい。

TLC の結果からも、グルコースのバンドの発現から、ヒダカコンブ、ヒダカ根コンブおよびアラメの 3 製品からラミナランが検出された。F1 の収率は大きいがラミナランが検出されなかった海藻のうち、ヒジキ類の F1 には主にアルギン酸が存在することが示された。フェノール硫酸法によるアルギン酸の発色（490 nm における吸光度）はラミナランの約 1/5 であったが、ヒジキから粗抽出した F1 の発色量もラミナランの約 1/5 から 1/4 程度であった。アルギン酸の精製の際には希塩酸等で前処理するのが常法である<sup>82)</sup>が、この操作で海藻の種類によってはかなりのアルギン酸を損失する可能性がある。ホシメカブのガラクトースおよびフコースの位置の明確なバンドから、フコイダンの存在が示された。ツルモではフコースよりわずかに高い位置にのみ明確なバンドが認められ、ホシメカブとは構成の異なるフコイダンあるいは他の成分が存在していると考えられる。

本章でのヒト糞便を用いた実験ではラミナランから主に酪酸が生成され、同じ提供者にもかかわらず、主に乳酸が生成された第 1 節の実験結果とは異なり、Michel et al.<sup>67)</sup> の報告例と一致した。前にも述べたように腸内フローラは様々な因子により変動するため、例えば一部の地域で行った実験を一般的な現象として捉えるには注意が必要であると考えられる。

糞便フローラによるアラメの F3（不溶性画分）の発酵試験でアルギン酸ナトリウムの発酵の場合と同様の SCFAs が生成されたことから、不溶性あるいは難溶性のアルギン酸の存在が考えられる。F2 の収率は 10 ~ 66 % と製品により大きく異



なったが、不溶性成分あるいはヒジキ類のように希塩酸画分にもある程度存在していることを考慮して、ヒダカコンブ、アラメ以外の製品中で主な発酵性多糖類はアルギン酸であると考えられる。Michel et al.<sup>67)</sup> は *Himanthalia elongata*, *L. digitata* および *Undaria pinnatifida* (ワカメ) と、アルギン酸、ラミナランおよびフコイダンのヒト糞便による発酵パターンを比較し、それぞれアルギン酸の発酵パターンと類似することを報告しているが、これらの海藻中でもラミナランの含有量は小さく発酵に関与しなかったものと思われる。今回のヒト糞便培養試験ではアラメの F1, F2 から生成される SCFAs 組成は、それぞれラミナランおよびアルギン酸から生成されるものと同様で、pH の低下が示された。アラメ粉末では pH 低下が示されたものの SCFAs の増加は認められなかった。今回測定の対象とした SCFAs 以外にもコハク酸やギ酸などの有機酸の生成が考えられるが、いずれにしても F1, F2 の発酵性とは異なる。また、F3 は F2 と同様の SCFAs 組成を示したが pH の低下が認められなかった。これらの結果には多糖類以外の成分も深く関与するものと考えられる。この点についてはさらに第 4 章でラットを用いて検討する。

以上の結果から、乾燥海藻製品 22 種類のいずれにもアルギン酸が、ヒダカコンブおよびアラメにはラミナランも相当量含まれていることが示された。海藻種の違いによりそれぞれ含有量が大きく異なることから、海藻そのものを摂取した場合の腸内フローラに及ぼす影響、さらに健康に与える影響も異なることが考えられる。

次章では日常よく食される海藻のラット盲腸内フローラおよび血中脂質に及ぼす影響について検討した。

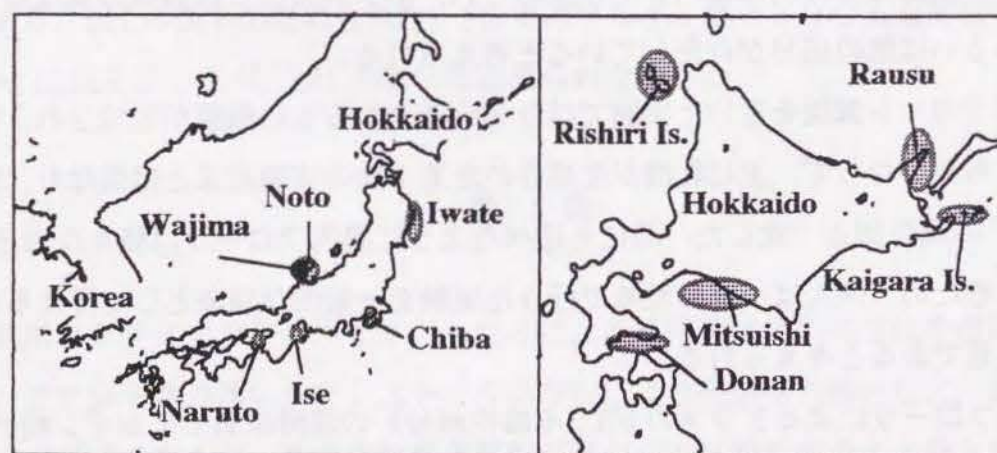


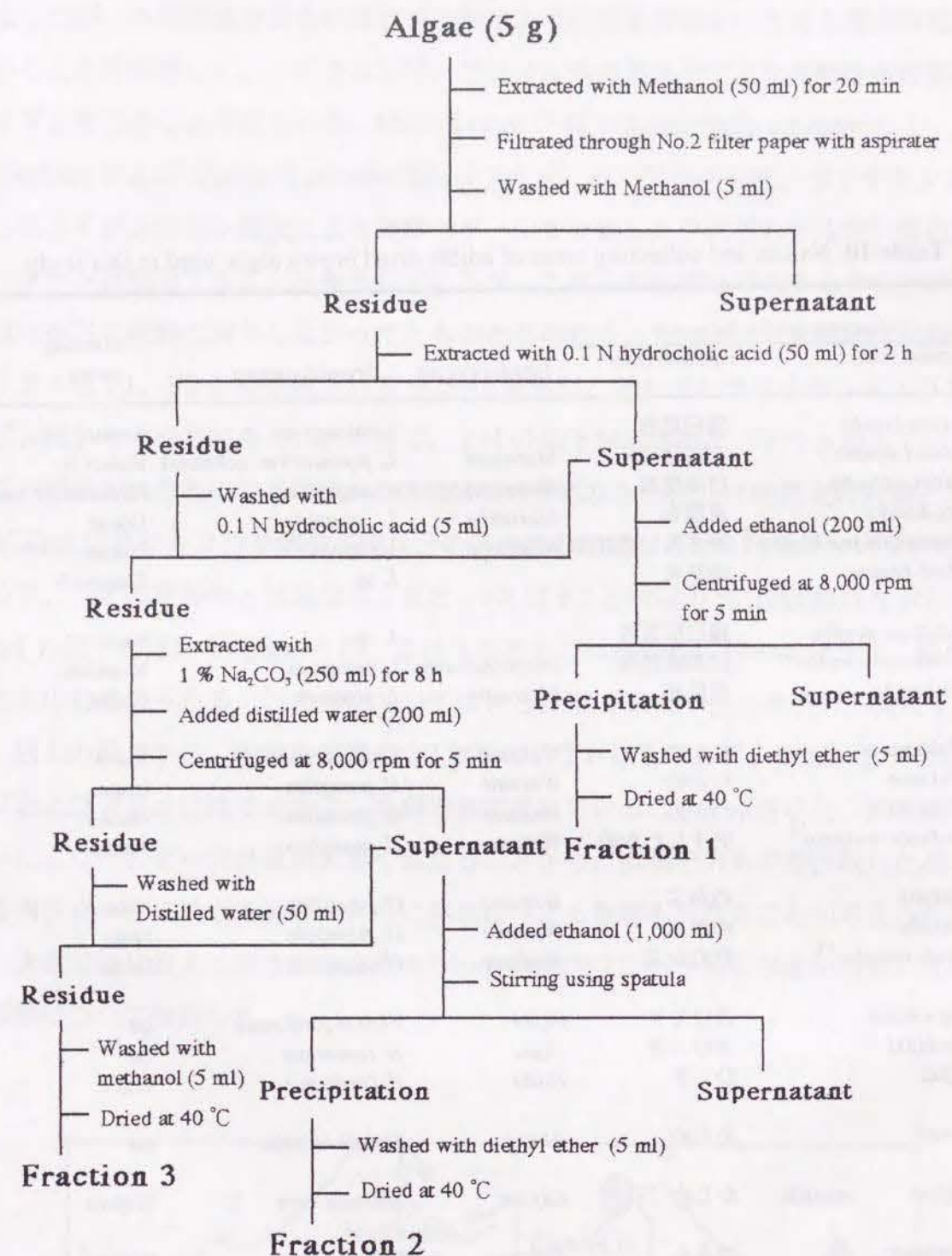
Fig. 1 The collecting areas of brown algae used in this study

Table 10 Names and collecting areas of edible dried brown algae used in this study

Market name (in Japanese)		Japanese name	Scientific name	Collecting areas
Roman letter	Japanese letter			
Rausu-kombu	羅臼昆布		<i>Laminaria</i> sp.	Rausu
Rishiri-kombu	利尻昆布	Makombu	<i>L. japonica</i> var. <i>ochotenis</i>	Rishiri Is.
Hidaka-kombu	日高昆布	Mitsuishikombu	<i>L. angustata</i>	Mitsuishi(Hidaka)
Ma-kombu	真昆布	Makombu	<i>L. japonica</i>	Donan
Kanzarashi-ma-kombu <sup>*1</sup>	寒ざらし真昆布	Makombu	<i>L. japonica</i>	Donan
Maki-kombu	巻昆布		<i>L. sp.</i>	Kaigara Is.
Rausu-ne-kombu	羅臼根昆布		<i>L. sp.</i>	Rausu
Hidaka-ne-kombu	日高根昆布	Mitsuishikombu	<i>L. angustata</i>	Mitsuishi
Ne-kombu	根昆布	Makombu	<i>L. japonica</i>	Donan
Wakame	わかめ	Wakame	<i>Undaria pinnatifida</i>	Korea
Wakame	わかめ	Wakame	<i>U. pinnatifida</i>	Iwate
Wakame	わかめ	Wakame	<i>U. pinnatifida</i>	Naruto
Haiboshi-wakame <sup>*2</sup>	灰干しわかめ	Wakame	<i>U. pinnatifida</i>	Naruto
Mekabu	めかぶ	Wakame	<i>U. pinnatifida</i>	Noto
Mekabu	めかぶ	Wakame	<i>U. pinnatifida</i>	Iwate
Hoshi-mekabu <sup>*3</sup>	乾めかぶ	Wakame	<i>U. pinnatifida</i>	Iwate
Naga-hijiki	長ひじき	Hijiki	<i>Hizikia fusiformis</i>	Ise
Me-hijiki	芽ひじき	Hijiki	<i>H. fusiformis</i>	Ise
Hijiki	ひじき	Hijiki	<i>H. fusiformis</i>	Chiba
Arame	あらめ	Arame	<i>Eisenia bicyclis</i>	Ise
Kajime	かじめ	Kajime	<i>Ecklonia cava</i>	Wajima
Tsurumo	つるも	Tsurumo	<i>Chorda filum</i>	Wajima

<sup>\*1</sup> Drying in the winter. <sup>\*2</sup> Drying with ash. <sup>\*3</sup> Without boiling and salting.







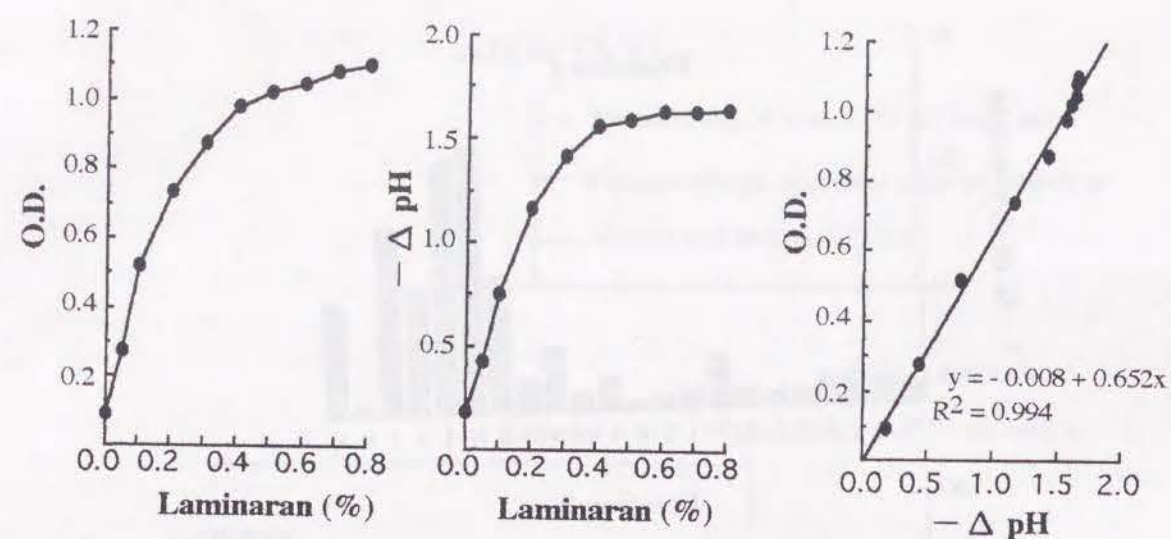


Fig. 4 Effect of laminaran on growth of *Clostridium ramosum*

*C. ramosum* was incubated with or without laminaran at 37 °C for 24 h under 100 % CO<sub>2</sub>.

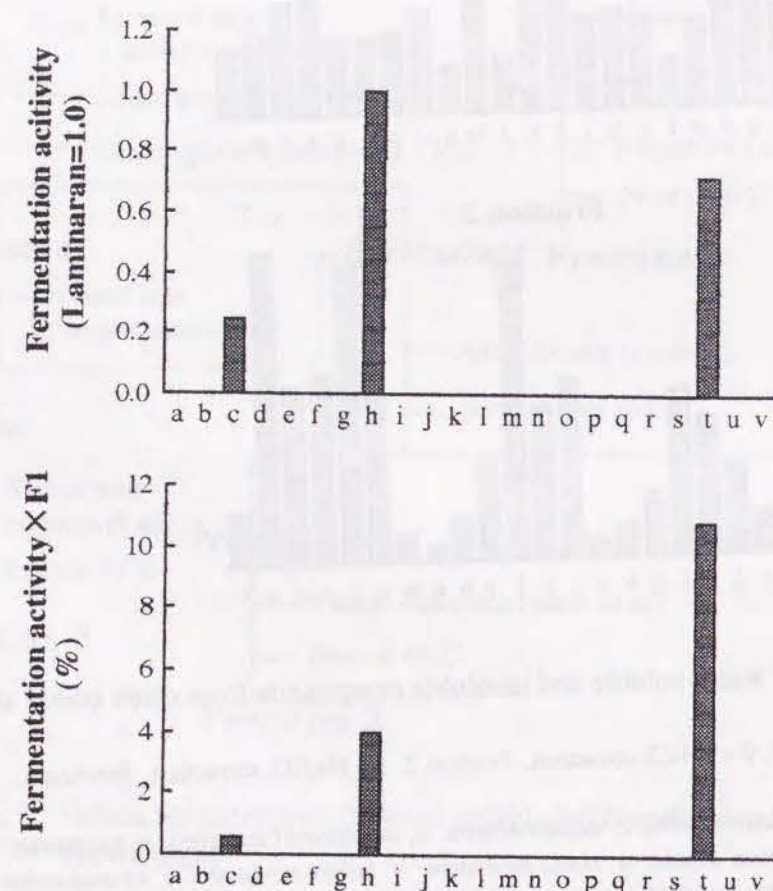


Fig. 5 Fermentability of 0.1N HCl extract of dried algae by *Clostridium ramosum*

See footnotes of Fig. 3

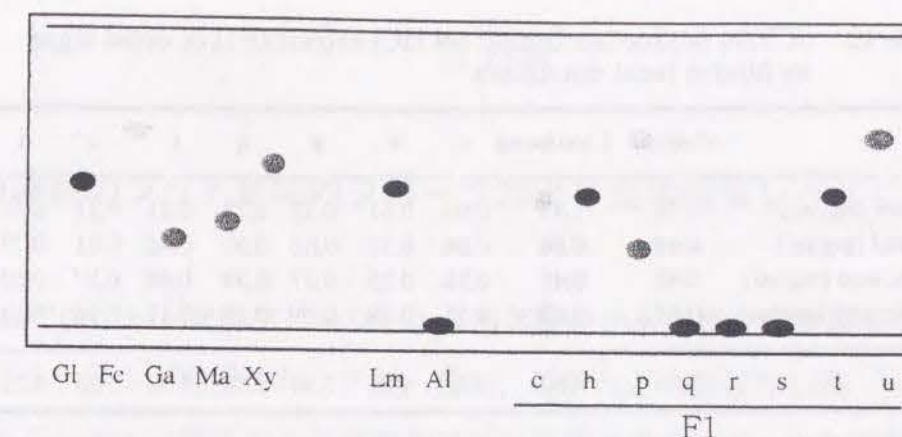


Fig. 6 TLC of 0.1 N HCl extract(F1) of dried algae

TLC; Aluminiumoxid<sup>TM</sup> 60 F<sub>254</sub>(MERCK). Eluent; 2-propanol-acetone-0.1M lactate(4:2:2, v/v). Detection; diphenylamine-aniline-phosphate solution.

Gl; glucose, Fc; fucose, Ga; galactose, Ma; mannose, Xy; xylose, Lm; laminaran, Al; sodium alginate (AG5), c; *hidaka-kombu*, h; *hidaka-ne-kombu*, p; *hoshi-mekabu*, q; *naga-hijiki*, r; *me-hijiki*, s; *hijiki*, t; *arame*, u; *tsurumo*.

Lm, Al and F1 were hydrolyzed by 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 95 °C for 2 h.

Table 11 TLC<sup>\*1</sup> of 0.1N HCl extract (F1) of dried algae

Saccharides	Rf	F1 *2 *3							
		c	h	p	q	r	s	t	u
Glucose (Laminaran <sup>*3</sup> )	0.53	+	++	—	—	—	—	++	—
L-Fucose	0.67	t	t	+	t	t	t	—	+
Galactose	0.35	t	t	+	t	t	t	—	—
Mannose	0.37	—	—	—	—	—	—	—	—
Xylose	0.60	—	—	—	+	+	+	—	—
Na-alginate <sup>*3</sup>	0.00	t	t	t	—	—	—	t	t

\*1 Aluminiumoxid<sup>TM</sup> 60 F<sub>254</sub> (MERCK). Eluent; 2-propanol-acetone-0.1M lactate(4:2:2, v/v). Detection; diphenylamine-aniline-phosphate solution.

\*2 c; *Hidaka-kombu*, h; *Hidaka-ne-kombu*, p; *Hoshi-mekabu*, q; *Naga-hijiki*, r; *Me-hijiki*, s; *Hijiki*, t; *Arame*, u; *Tsurumo*.

\*3 Hydrolyzed by 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 95°C for 2 h.

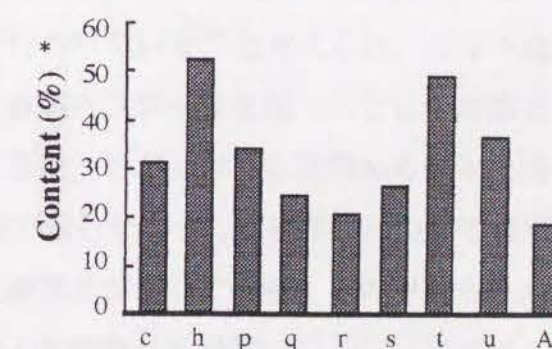


Fig. 7 Total saccharides in 0.1 N HCl extract (F1) of dried algae

See footnotes of Fig. 6. Saccharides were assayed by phenol-sulfuric acid.

\* Laminaran = 100%.



**Table 12** SCFAs production from 0.1N HCl extraxt (F1) of dried algae by human fecal microflora

SCFAs	Control	Laminaran	c	h	p	q	r	s	t	u
Lactic acid (mg/ml)	0.20	1.45	0.66	0.61	0.32	0.22	0.21	0.21	0.58	0.31
Acetic acid (mg/ml)	0.44	0.84	0.64	0.52	0.62	0.50	0.46	0.61	0.72	0.61
Propionic acid (mg/ml)	0.42	0.48	0.53	0.35	0.57	0.59	0.46	0.57	0.60	0.74
n- Butyric acid (mg/ml)	0.15	0.67	0.32	0.79	0.19	0.15	0.11	0.16	0.37	0.22
pH	5.96	4.80	5.47	4.82	5.90	5.82	5.83	5.86	5.33	5.92

Human fecal cultures with or without 1% of fraction 1 and incubated at 37°C for 24 h under 100 % CO<sub>2</sub>. See footnotes of Table 11.

**Table 13** SCFAs production from fractions of *arame Eisenia bicyclis* by human fecal microflora

SCFAs (mg/ml)	Control	Laminaran	Sodium alginate	Arame powder	Fraction		
					1	2	3
Lactic acid (mg/ml)	N.D.	1.24	0.08	0.05	0.60	0.06	0.06
Acetic acid (mg/ml)	1.24	0.70	1.74	1.20	0.83	1.74	1.91
Propionic acid (mg/ml)	1.09	0.56	1.03	0.92	0.59	1.03	1.27
n- Butyric acid (mg/ml)	0.38	1.26	1.26	0.53	1.29	0.62	0.81
pH	6.03	4.85	5.64	5.65	5.33	5.79	6.08

See footnotes of Table 11.

## 第2章

### 食用海藻類のラット盲腸内フローラおよび血中脂質レベルに及ぼす影響

第1章では、ヒト糞便フローラにより海藻類中の多糖類、食物繊維であるアルギン酸やラミナランが発酵され、乳酸、酢酸、酪酸などの短鎖脂肪酸（SCFAs）が生成されることから、海藻または海藻多糖類の摂取は腸内フローラに影響を与える可能性があることを示した。また、これらの発酵性多糖類の含有量は海藻種や製品によって大きく異なり、腸内フローラに与える影響も海藻種によって大きく異なることが示唆された。

海藻の摂取による健康に対する有用性のうち、ミネラルの供給、食物繊維による便秘改善などはよく知られているが、その他に血中脂質の上昇抑制も報告され<sup>1)</sup>、高脂血症、特に高コレステロール血症の予防、改善を目的として海藻が摂取されることも多い。コレステロールは性ホルモンなどの前駆体となる極めて重要な栄養素であるが<sup>48)</sup>、欧米諸国のみではなく我が国でも現代の食生活では脂肪摂取は過剰であり、高コレステロール血症は、肥満、高血圧とともに成人病の大きな要因のひとつである。緒言で述べたように、食物繊維による血中コレステロールの抑制には、腸内フローラによる代謝によって生成される SCFAs が深く関わっている<sup>50-53)</sup>と考えられている。

そこで、本章では実際に海藻の摂取が腸内フローラ、また腸内フローラを介して宿主の健康、特に血中脂質に及ぼす影響を明らかにするため、ラットを用いた実験を行った。なお、実験動物として頻繁に利用されるラット、マウス、モルモットなどは盲腸が発達しており、ヒトの大腸内での腸内フローラによる働きが、これらの動物では盲腸内で行われている<sup>25)</sup>と考えられ、ラットなどを用いて腸内フローラを検討する際には、盲腸内フローラを調べるのが常法となっている。

緒言で述べたように、わが国は有史以前から様々な海藻が食されており<sup>1-3)</sup>、また、第1章第2節で示したように、褐藻類については現在でもスーパーマーケットなどで多種類の乾燥製品が入手できる。その中でも、本章では一般の家庭で料理に用いられる褐藻類の乾燥製品5種類（コンブ、ワカメ、メカブ、アラメ、ヒジキ）および生モズク、緑藻類のアオノリ、アオサ、および紅藻類のノリの乾燥製品につ



いて、それぞれ1%または5%混餌食をラットに摂取させ、盲腸内フローラおよび血清脂質等に及ぼす影響を調べた。

#### 実験材料および方法

##### 食餌

道東産素干しコンブ *Laminaria* sp., 岩手産乾燥(湯通し塩蔵)ワカメ *Undaria pinatafida* (成葉体), 岩手産乾メカブ(ワカメ成実葉), 伊勢産干しアラメ *Eisenia bicyclis*, 沖縄産生モズク(オキナワモズク *Cladosiphon okamuranus*), 伊勢産干しヒジキ *Hizikia fusiformis*, 鹿児島産干しアオサ(ヒトエグサ *Monostroma nitidum*), 瀬戸内産粉アオノリ *Enteromorpha* sp. および干しノリ(アマノリ *Porphyra* sp. 生産地の記載なし) は家庭用にパックされた市販製品を購入した。乾燥製品については小型粉碎器(SCM-40A, 柴田硝子, 東京)を用いて粉碎した後, モズクは脱イオン水で3回洗浄し, 40℃で一晩乾燥した後でそれぞれ試験食に混餌した。Table 14, 15に示した食物繊維を含まない準精製飼料(AIN-76)<sup>85)</sup>をコントロール食とし, それぞれ1%および5%の海藻飼料をコーンスターチと置き換えたものを試験食とした。

##### 動物実験

1回の動物実験で4週齢のWistar系雄ラット(日本SLC, 静岡)16匹を使用した。無作為に1群4匹ずつ, 4群に分け, 金属性飼育ケージに入れ, コントロール食を2日間与えた後, 1群にコントロール食を, 他の3群に試験食を1週間摂取させた。その間, 食餌および水(水道水)は自由摂取させ, 投与期間中の体重および糞便重量(1群4匹の合計)を毎日測定した。投与最終日にラットをジエチルエーテル麻酔下で腹部大動脈から全採血し致死させ, 盲腸(内容物を含む)および肝臓を摘出しこれらの重量を測定した。血液は凝集促進剤(セパラピット, 積水化学)の入った小試験管にとり, 遠心分離(2,220×g, 30 min)し, 血清脂質の分析に供した。盲腸内容物は速やかに微生物フローラの検索, pHおよびアンモニア濃度の測定に供した。

上記の実験を計6回行い, 9種類の海藻製品それぞれの1%および5%食について検討した。

##### 盲腸内 pH およびアンモニア

盲腸内の pH は内容物約 0.1 g を 20 倍量の脱イオン水に懸濁し, 電極(堀場 6366 型)を用いて測定した。この懸濁液を脱イオン水でさらに 8 倍希釈し, 測定キット(アンモニアテストワコー, 和光純薬)を用いてアンモニア量を測定した。

##### 血清脂質

血清中のトリグリセリド(TG), 総コレステロール(TC)および遊離脂肪酸(NEFA; nonesteride fatty acid)はそれぞれ測定キット(トリグリセライド G-テストワコー, コレステロール E-テストワコー, NEFA-C-テストワコー, 和光純薬)を用いて測定した。

##### 盲腸内微生物フローラ

盲腸内フローラの検索は光岡の方法<sup>86)</sup>に準じて以下の様に行った(Table 16)。3種類の非選択培地(EG, BL, TS)および6種類の選択培地(LBS, BS, ES, DHL, TATAC, PEES)に盲腸内容物希釈液を 0.05 ml ずつ塗抹し, 嫌気培養(EG, BL, LBS, BS, ES)の場合には 48 から 60 h, 好気培養の場合には 24 h (TS, DHL, TATAC)あるいは 48 h (PEES)培養し, 各平板培地に出現したコロニーについてコロニー形態, 計数, グラム染色性, 細胞形態, 芽胞の有無および好氣的発育の有無を観察し, 属レベルの検索を行った。嫌気培養はスチールウール法を用いて行った。

#### 結 果

本研究の動物実験の結果は Fig. で示すが, 各実験の数値については「付表2 動物実験に関するデータ」に全て記した。

##### 体重, 糞便, 盲腸および肝臓重量

1%および5%海藻食を投与した場合の各重量に及ぼす影響を Fig. 8~11 に示した。コントロール食群と比べ, 1%ワカメ食および5%アオノリ食群において体重増加量が有意に大きく, 5%ノリ食群においてもその傾向がみられた(Fig. 8)。糞便重量はほとんどの試験食群で有意に増加し, 有意差のみられなかった試験食群でも増加する傾向であった(Fig. 9)。特に緑藻類のアオノリおよびアオサ食に



よって増加した。盲腸重量は5%ヒジキ、5%ノリ、5%コンブ、5%ワカメおよび5%アラメにより有意に増加した (Fig. 10)。1%および5%ノリ食および1%モズク食群において肝臓重量が有意に小さかった (Fig. 11)。

#### 盲腸内 pH およびアンモニア濃度

各試験食における盲腸内 pH およびアンモニア濃度への影響を Fig. 12 および 13 に示した。緑藻類のアオサおよびアオノリの5%食群において、盲腸内 pH 値がコントロール食群と比べて有意に高かった (Fig. 12)。コンブおよびモズク以外の各5%海藻食群において盲腸内アンモニア濃度が有意に抑制され、またコンブおよびモズクでも抑制される傾向を示した (Fig. 13)。1%食ではアオノリ、ノリ、モズクがアンモニア濃度を有意に抑制した。

#### 血清脂質

血清 TG は1%コンブおよびワカメ食を除き、ほとんどの試験食により有意に抑制されるか、抑制される傾向を示した (Fig. 14)。一方、血清 TC は各試験食による大きな変化はなく、5%メカブおよび5%ノリ食群で抑制される傾向があったが有意な差ではなかった (Fig. 15)。NEFA レベルは個体間のバラツキが大きかったが各海藻5%食により有意に抑制、または抑制される傾向であり、1%食ではアオサ、ノリおよびコンブによって有意に抑制された (Fig. 16)。

#### 盲腸内微生物フローラ

各試験食を与えた場合の盲腸内フローラの結果を Fig. 17 ~ 20 に示した。5%コンブ、5%ワカメ、5%メカブおよび5%アオサ食群において盲腸内の最優勢菌群である bacteroidaceae が抑制され、一方、5%ノリ食では有意に増加した。Eubacteria および peptococcaceae の菌数はバラツキが大きかったが、1%アラメ食群において peptococcaceae が有意に増加した。5%ワカメ食群において bifidobacteria が抑制された。一方、1%メカブおよび5%ノリ食群において bifidobacteria 菌数が増加し、1%および5%メカブ食群において腸内フローラ全体の菌数に対する bifidobacteria の菌数の割合 (ビフィズス菌占有率) が有意に増加した。また、ばらつきが大きいその他の海藻でも各1%の場合、bifidobacteria 菌数およびビフィズス菌占有率は増加する傾向を示した。lactobacilli はノリ以外の5%海藻食で有意に抑制されるか、あるいは抑制される傾向であった。5%モズク食により Staphylococci が抑制され、5%ワカメ食で抑制される傾向であった。

Enterobacteriaceae は1%コンブ、5%メカブ、5%アオサおよび5%アオノリ食群で有意に抑制された。総生菌数は5%アオサ食で有意に減少し、5%ノリ食で増加の傾向であった。

#### 考 察

食用海藻のラット盲腸内フローラ及び血中脂質への影響を総合的に考察するため、各試験毎にコントロール群と比較して有意差のあった結果を Table 17 にまとめて示した。

ほとんどの海藻食群において一様に糞便量の増加、盲腸内アンモニア濃度の抑制がみられ、また血清脂質に対しても一様で、各海藻により TC には大きな変化が認められないものの血清 TG および NEFA の抑制または抑制の傾向がみられた。これらの結果は不溶性または非発酵性の食物繊維に関する知見<sup>45-47)</sup>と一致している。海藻の種類によってはその乾燥体を水に戻すと、乾燥重量の約20倍もの重量になるものがあることが Suzuki et al.<sup>87)</sup>により報告されており、今回の実験でも腸管内において海藻粉末が水分を吸収し膨潤したため、糞便の排泄量の増加と腸内容物の希釈が行われたものと考えられる<sup>88)</sup>。一方、いくつかの海藻食群でみられた盲腸重量の増加、およびメカブ、ノリ食で認められた bifidobacteria の増加などは発酵性の食物繊維の特徴であり<sup>45-47)</sup>、海藻由来の多糖類で発酵性のアルギン酸ナトリウム (褐藻類細胞壁多糖類)、ラミナラン (褐藻類貯蔵多糖類) およびキシラン/マンナン (アマノリ属細胞壁多糖類) なども同様の生理活性を持つと考えられる。

今回の実験で各海藻1%食によりビフィズス菌占有率の増加傾向が認められたが、有意に bifidobacteria 菌数を増加させたのはメカブおよびノリであった。これらの5%海藻食では有意差はないが血清 TC が減少する傾向が示され (Fig. 15)、肝臓重量がノリ食では有意に減少し、メカブでは減少する傾向が示された (Fig. 11)。緒言で述べたように発酵性の多糖類の方が非発酵性の多糖類よりも血中 TC レベルの上昇を抑制することが報告されている<sup>51-53)</sup>。メカブおよびノリでも盲腸内の有意な pH の低下は認められなかったが、腸内発酵が血中脂質レベルに影響を及ぼしている可能性がある。

ワカメの成実葉であるメカブの摂取により bifidobacteria 菌数やビフィズス菌占



有率が増加したが、ワカメ成体葉（いわゆる一般的に摂食される部分）を摂取させた場合にはこのような bifidobacteria の増加は認められなかった。今回の実験で用いたワカメとメカブでは葉の部位や乾燥製品にするまでの前処理（それぞれ“湯通し塩蔵”と“素干し”）などが違う<sup>3)</sup> ため、含有成分の組成が大きく異なり腸内フローラに及ぼす影響も大きく異なると考えられる。特にオリゴ糖、食物繊維などの構成糖の違いは腸内フローラに大きく影響すると考えられる。山中ら<sup>89)</sup> はメカブの粘性物質（アルギン酸）はワカメの粘性物質より粘度が大きく、ブタ盲腸内容物による SCFAs の産生速度や産生量などはメカブの方が小さいことを報告している。本研究の場合、ワカメとメカブでは盲腸内 pH に差はなかった (Fig. 12) が、メカブの方が bifidobacteria を増加させており、メカブ中のアルギン酸以外の成分が関与している可能性も考えられる。

ノリ食におけるラット盲腸内ビフィズス菌占有率の上昇は既に河津ら<sup>90)</sup> により報告されており、またノリ中の多糖類であるキシラン/マンナンがヒト腸内菌株によって発酵され、ラット盲腸内 bifidobacteria 菌数を増加させることも同氏ら<sup>91)</sup> によって報告されている。ノリの場合、コンブ、ヒジキ、ワカメなどの褐藻類とは異なり一度の食餌で摂取する量は少ないが、褐藻類よりも手軽に摂取できるため回数を増やせばその摂取によって腸内フローラを改善できると思われる。

腸内の pH が酸性側である場合、アンモニアやトリメチルアミンなどの塩基性腐敗産物の生成や腸管からのこれら腐敗物の吸収が抑制されること<sup>92-94)</sup>、また *Bifidobacterium* に好適な条件である<sup>95)</sup> ことなどから、腸内 pH は中性付近よりやや酸性側のほうが望ましいとされているが、緑藻類であるアオサやアオノリ食群で盲腸内 pH の上昇がみられた (Fig. 12)。その他の褐藻類 6 種類や紅藻類であるノリを摂取させた場合には盲腸内 pH の上昇は見られないため、この作用は緑藻類またはアオノリおよびアオサに特有の生理活性物質による可能性が考えられる。また、これらの 5 % 食は糞便重量を顕著に増加させ (Fig. 9)、盲腸内の Enterobacteriaceae を顕著に減少（それぞれコントロール食の約 1/30 および 1/60, Fig. 17, 19）させるなど、ラットに対して特徴的な影響を示した。

以上のように、ラットに 9 種類の食用海藻を与えた場合、各海藻とも一様に血清中の TG および血清 NEFA を抑制したが、各 5 % 海藻食では盲腸内フローラおよび腸内環境に対しては異なった影響が示された。各乾燥海藻の膨潤性から考慮すると食餌中に 5 % というのは過剰量であると考えられるが、各海藻の影響の特徴を知る

ためには重要な知見が得られたと考えている。各海藻 1 % 食では bifidobacteria の菌数および占有率が増加する傾向であり、腸内フローラに対して有用であることが示唆された。

海藻中には多いものでは乾燥重量の 40 % 以上もの食物繊維が含有されているが、抗菌性物質や抗酸化性物質などのほか様々な生理活性物質や栄養成分も含まれている<sup>6,7, 96-98)</sup>。そのため、それぞれの海藻食で見られた影響が食物繊維によるものか、あるいは食物繊維以外の成分によるものか明らかにする必要がある。そこで第 3 章ではまず精製された海藻多糖類、とくに腸内菌によって *in vitro* で発酵性が示されたアルギン酸およびラミナラン (Table 4) について、および第 4 章では海藻の粗抽出多糖類とその他の成分についてラットを用いた実験を行った。

Table 14 Components of control diets <sup>84)</sup>

Corn starch	33.0% (w/w)
Sucrose	33.0%
Casein	20.0%
Corn oil	6.8%
Mixed minerals *1	4.0%
Mixed vitamins *1	1.0%
Tyrosine	1.0%
Tryptophan	1.0%
Choline bitartrate	0.2%

\*1 See Table 15.

Table 15 Components of mixed minerals and mixed vitamins (AIN-76) <sup>84)</sup>

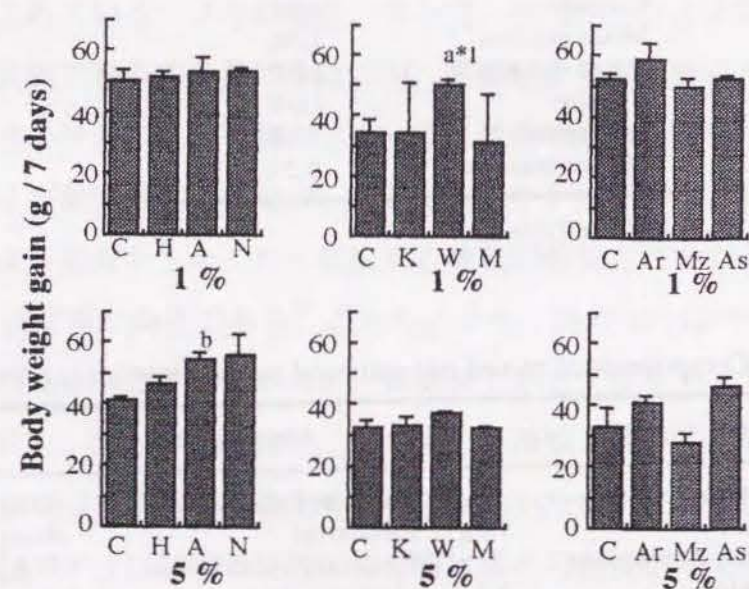
Mixed minerals		Mixed vitamins	
Calcium phosphate dibasic	50 g	Thiamine hydrochloride	60 mg
Sodium chloride	7.4 g	Riboflavine	60 mg
Potassium citrate monohydrate	22 g	Pyridoxine hydrochloride	70 mg
Magnesium oxide	2.4 g	Nicotinic acid	300 mg
Manganese carbonate	350 mg	Pantothenic acid calcium salt	160 mg
Iron (II) citrate	600 mg	Folic acid	20 mg
Zinc carbonate	160 mg	Biotin	2 mg
Copper carbonate	30 mg	Cyanocobalamin	0.1 mg
Potassium iodate	1 mg	Vitamin A acetate	40 mg
Sodium selenite	1 mg	Vitamin E acetate	500 mg
Chromium (II) potassium sulphate	55 mg	Vitamin D <sub>3</sub>	0.25 mg
Saccharose	17.4 g	Vitamin K	0.5 mg
		Saccharose	98.8 g



**Table 16.** Culture media for rat cecal microflora\*

Medium	Main enumerated microorganisms	Dilution to be plated	Incubation time (h)
Aerobic incubation			
TS blood agar	Predominant aerobes	$10^{-5}, -6, -7, -8$	24
DHL agar	Enterobacteriaceae	$10^{-2}, -3, -5, -7$	
TATAC agar	Streptococci		
PEES agar	Staphylococci		
			48
Anaerobic incubation (Steel wool method)			
EG agar	Predominant anaerobes	$10^{-5}, -6, -7, -8$	48-60
BL agar	Predominant anaerobes	$10^{-2}, -3, -5, -7$	
BS agar	Bifidobacteria		
ES agar	Eubacteria		
LBS agar	Lactobacilli		

\* Method of Mitsuoka<sup>89</sup>.

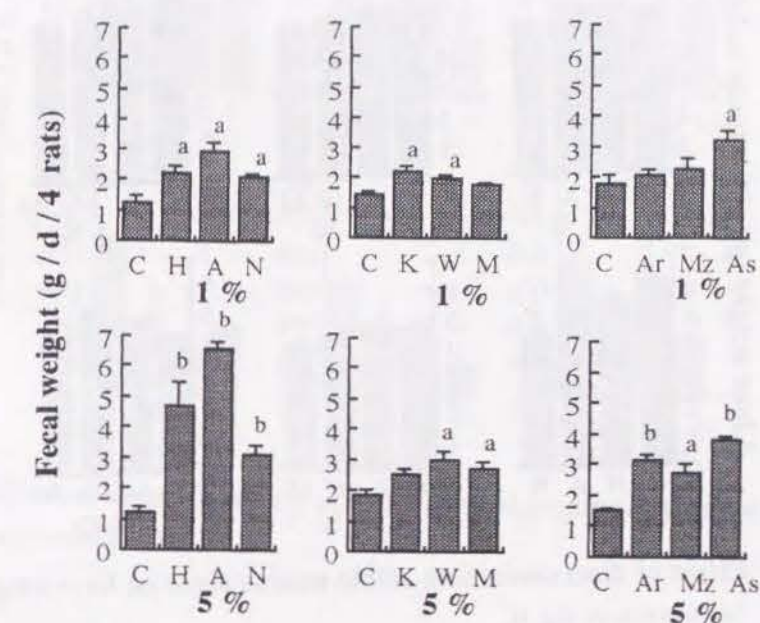


**Fig. 8** Effect of diets containing edible marine algae on body weight gain in rats

The rats were grouped (4 rats per group) and fed the following diet: Control diet (C), diet containing 1% or 5% *hijiki* (H), *aonori* (A), *nori* (N), *kombu* (K), *wakame* (W), *mekabu* (M), *arame* (Ar), *mozuku* (Mz) and *aosa* (As).

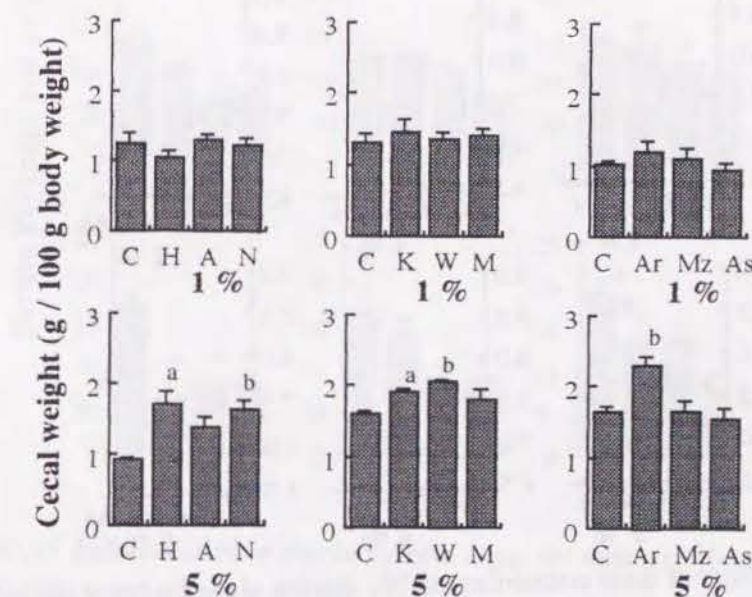
Vertical bars represent the standard error of the mean.

\*1 Significant difference from the control: a  $p < 0.05$ , b  $p < 0.01$ .



**Fig. 9** Effect of diets containing edible marine algae on fecal weight in rats

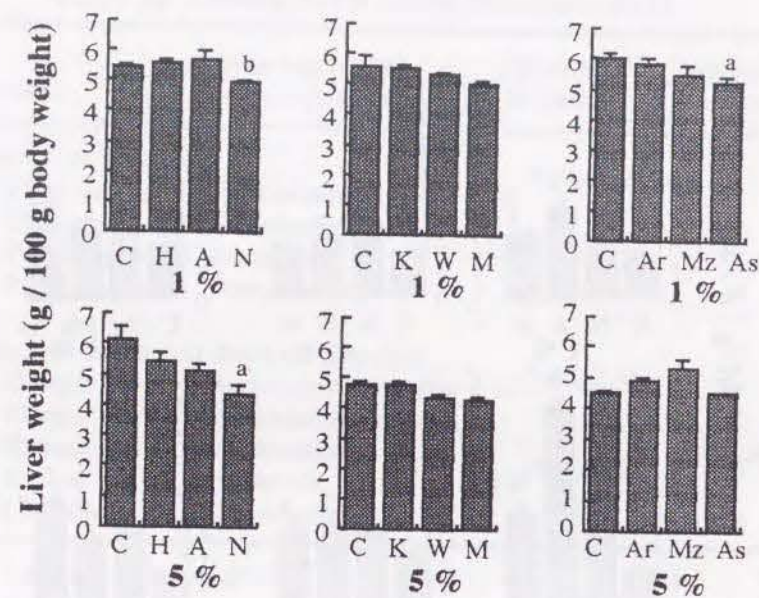
See footnotes of Fig. 8.



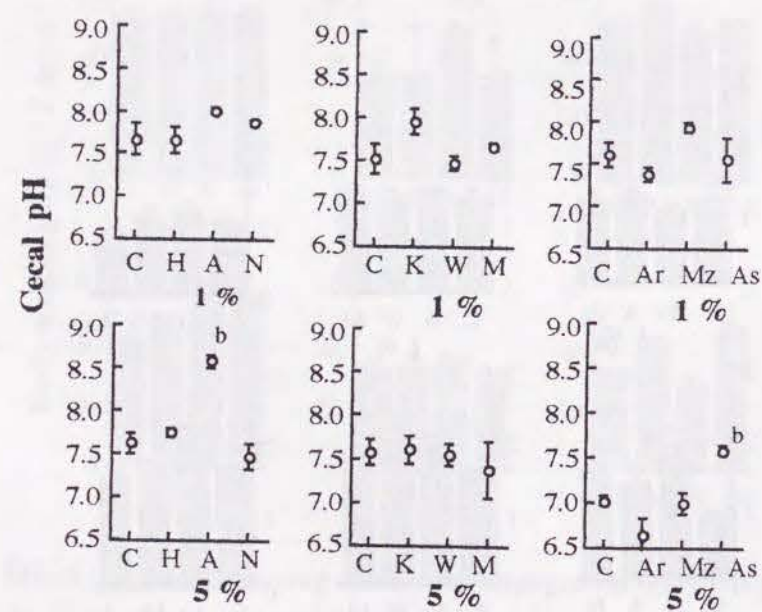
**Fig. 10** Effect of diets containing edible marine algae on cecal weight in rats

See footnote of Fig. 8.

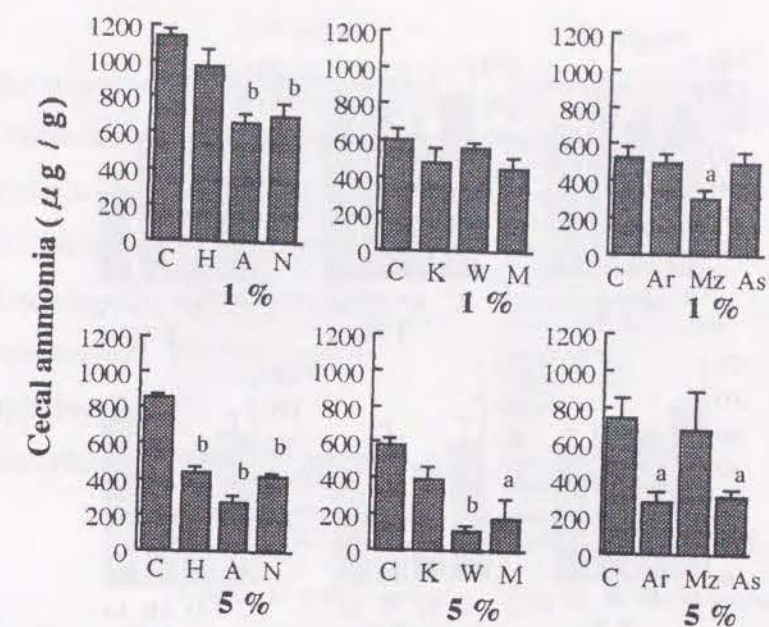




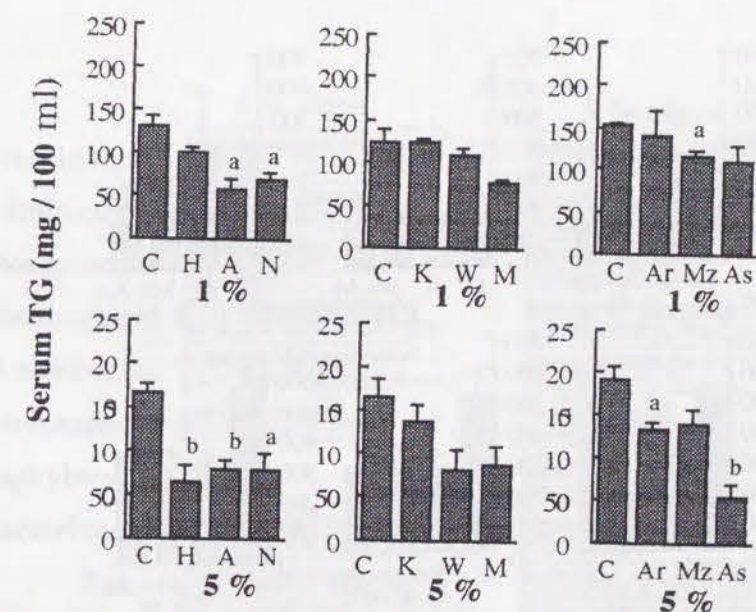
**Fig. 11** Effect of diets containing edible marine algae on liver weight in rats  
See footnote of Fig. 8.



**Fig. 12** Effect of diets containing edible marine algae on cecal pH in rats  
See footnote of Fig. 8.

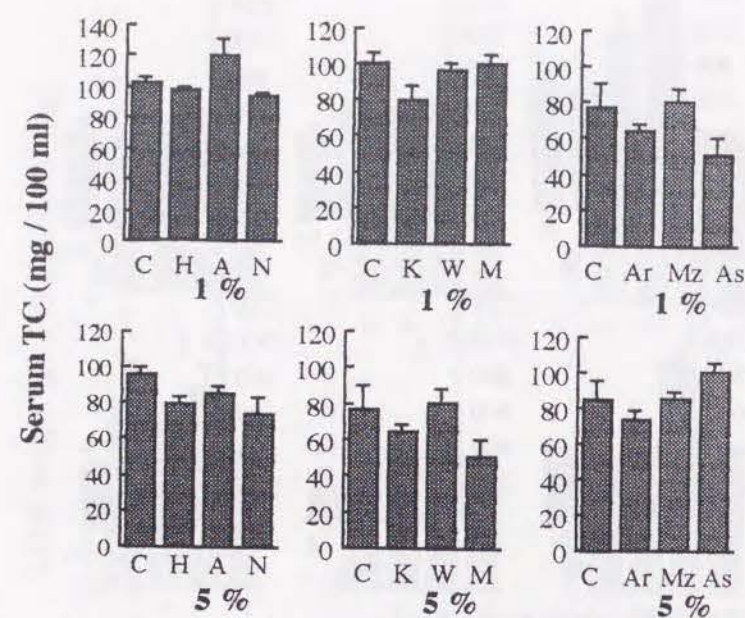


**Fig. 13** Effect of diets containing edible marine algae on cecal ammonia in rats  
See footnote of Fig. 8.

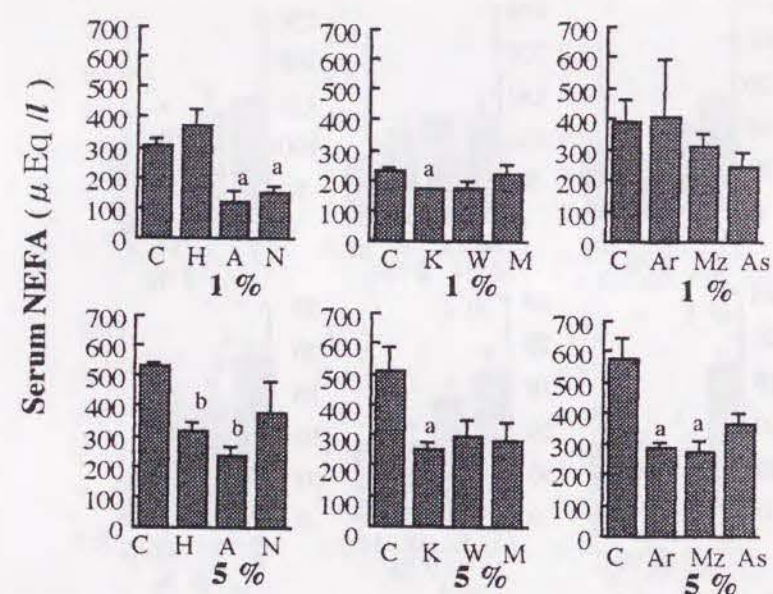


**Fig. 14** Effect of diets containing edible marine algae on serum triglycerides (TG) in rats  
See footnotes of Fig. 8.

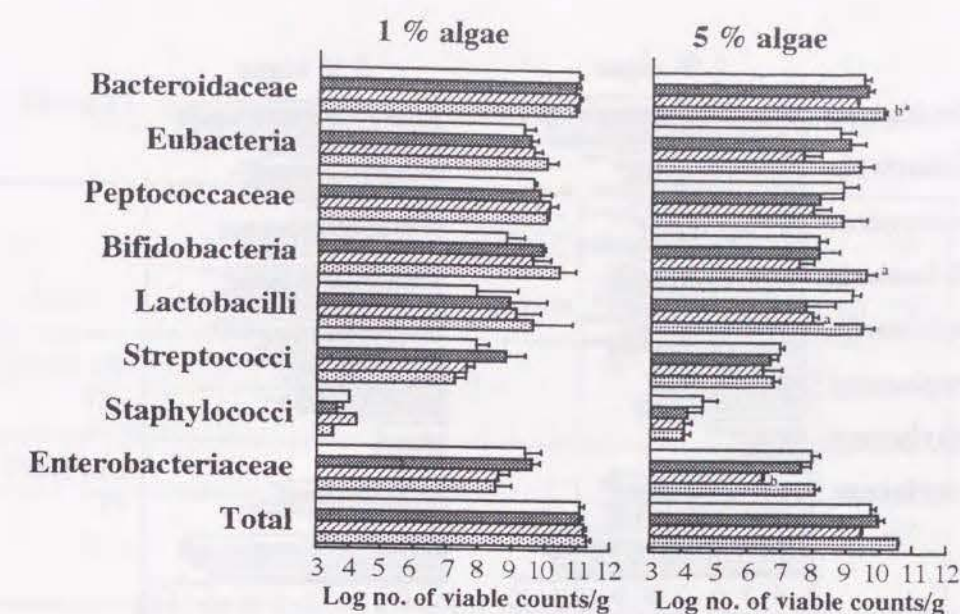




**Fig. 15** Effect of diets containing edible marine algae on serum total-cholesterol (TC) in rats  
See footnotes of Fig. 8.

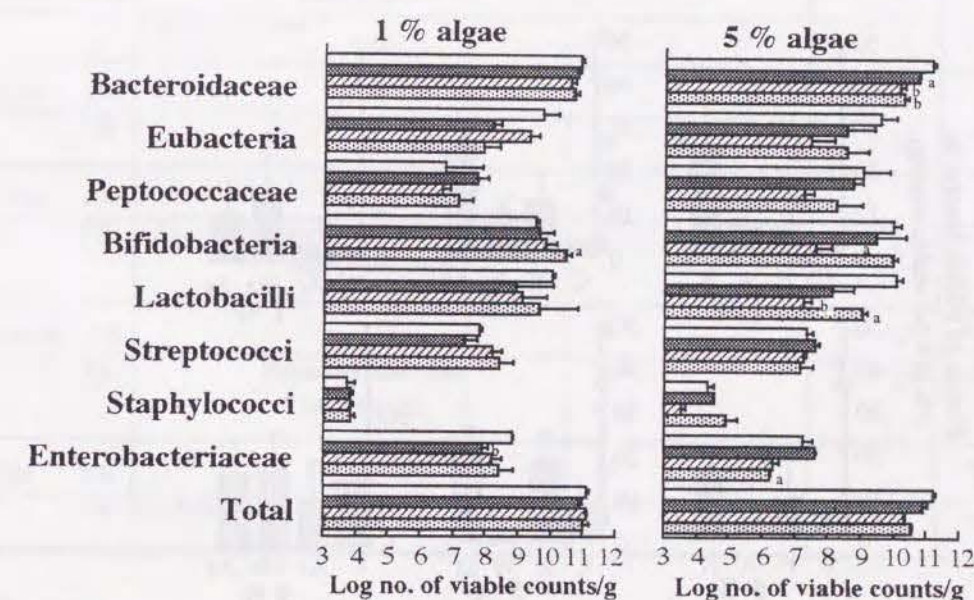


**Fig. 16** Effect of diets containing edible marine algae on serum nonesteride fatty acids (NEFA) in rats.  
See footnote of Fig. 8.



**Fig. 17** Effects of diets containing *hijiki*, *aonori* and *nori* on cecal microflora in rats

The rats were grouped (4 rats per group) and fed the following diets: Control diet (□), diet containing 1% or 5% *hijiki* (■), *aonori* (▨) and *nori* (▩).  
Horizontal bars represent the standard error of the mean.  
\* Significant difference from the control: a  $p < 0.05$ , b  $p < 0.01$ .



**Fig. 18** Effects of diets containing *kombu*, *wakame* and *mekabu* on cecal microflora in rats

See footnotes of Fig. 17. Control diet (□), diet containing 1% or 5% *kombu* (■), *wakame* (▨) and *mekabu* (▩).



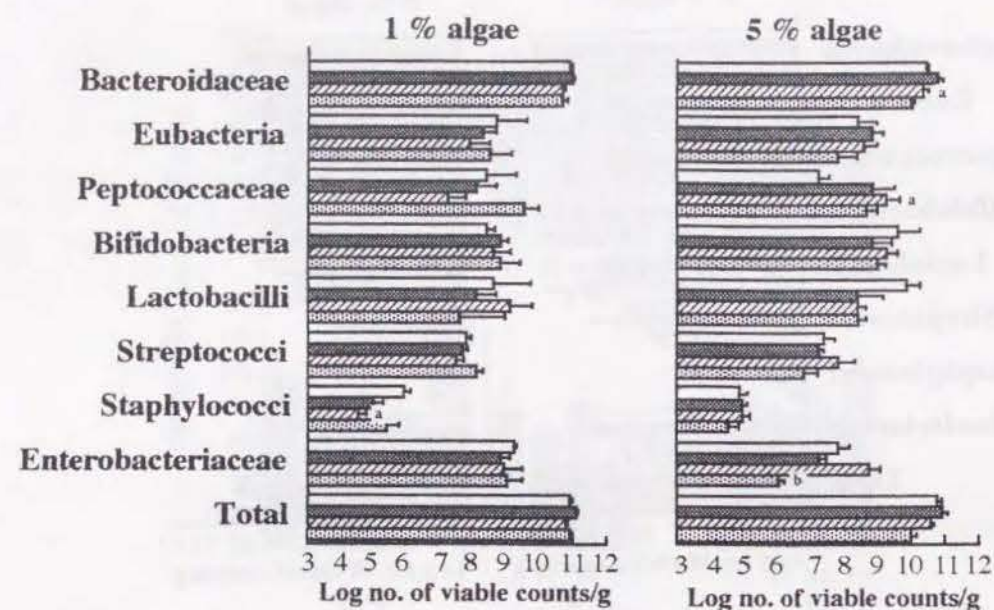


Fig. 19 Effects of diets containing *arame*, *mozuku* and *aosa* on cecal microflora in rats

See footnotes of Fig. 17. Control diet (□), diet containing 1% or 5% *arame* (■), *mozuku* (▨) and *aosa* (▩).

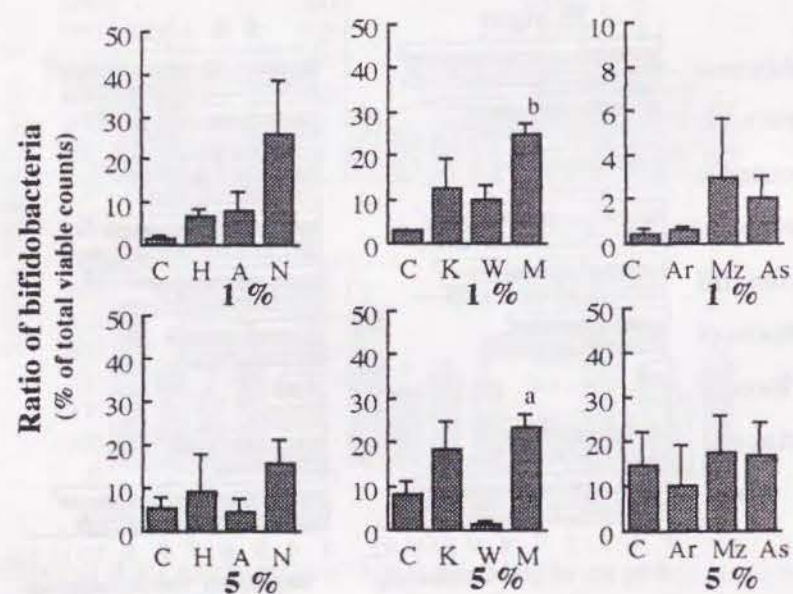


Fig. 20 Effect of diets containing edible algae on the ratio of cecal bifidobacteria in rats

The rats were grouped (4 rats per group) and fed the following diet: Control diet (C), diet containing 1% or 5% *hijiki* (H), *aonori* (A), *nori* (N), *kombu* (K), *wakame* (W), *mekabu* (M), *arame* (Ar), *mozuku* (Mz) and *aosa* (As).

Vertical bars represent the standard error of the mean.

Significant difference from the control: a  $p < 0.05$ , b  $p < 0.01$ .

Table 17 Summary of effects of edible marine algae on cecal microflora and levels of serum lipid in rats

Diets	Cecal microflora		Ratio of bifido-bacteria	Weight of			Cecal		Serum		
	Promotion	Suppression		Feces	Cecum	Liver	pH	NH <sub>3</sub>	TG	TC	NEFA
<i>Kombu</i> 1%		Enterobacteriaceae		▲							▽
5%		Bacteroidaceae			▲						▽
<i>Wakame</i> 1%				▲							
5%		Bacteroidaceae		▲	▲		▽				
		Lactobacilli									
		Bifidobacteria									
<i>Mekabu</i> 1%		Bifidobacteria	▲								
5%		Bacteroidaceae	▲	▲			▽				
		Enterobacteriaceae									
		Lactobacilli									
<i>Arame</i> 1%											
5%				▲	▲		▽		▽		▽
<i>Mozuku</i> 1%		Staphylococci					▽		▽		
5%		Peptococcaceae		▲							▽
<i>Hijiki</i> 1%				▲							
5%				▲	▲		▽		▽		▽
<i>Aosa</i> 1%				▲		▽					
5%		Enterobacteriaceae		▲			▲	▽	▽		
		Bacteroidaceae									
<i>Aonori</i> 1%				▲			▽		▽		▽
5%		Enterobacteriaceae		▲			▲	▽	▽		▽
		Lactobacilli									
<i>Nori</i> 1%				▲		▽			▽		▽
5%		Bifidobacteria		▲	▲	▽			▽		

The effects were significantly different from the control of each test (Fig. 8 ~ 20).  $p < 0.05$ .

▲ : up or promotion, ▽ : drop or suppression.



### 第3章

#### 海藻多糖類のラット盲腸内フローラおよび血中脂質レベルに及ぼす影響

緒言で述べたように、海藻類には陸上植物にはみられない特異的な難消化性多糖類（食物繊維）が多く含まれている<sup>6-8)</sup>。第1章の実験結果から海藻多糖類のうちラミナランおよびアルギン酸が腸内フローラによって発酵されることが示された。アルギン酸は褐藻類中に多く含まれる多糖類で、工業的に生産され、増粘剤、安定剤などとして加工食品に利用されている。また紅藻多糖類であるカラギーナンや寒天なども同様に広く利用されている<sup>1-3)</sup>。ラミナランは $\beta$ -1,3結合グルカンからなる褐藻類中の貯蔵多糖類で、第1章第2節でも示したようにアラメからの大量抽出は可能と思われる<sup>78,80)</sup>が、粘性が低く食品工業的には利用されていない。これらの多糖類は陸上植物由来の食物繊維と同様に、健康に対する機能性、特に高脂血症や抗腫瘍性に関する多くの知見が報告されてきた<sup>99-102)</sup>が、腸内フローラに及ぼす影響についての報告はまだ少ない。

前章では粉末海藻をそのまま食餌に混ぜてラットに与え、盲腸内フローラや血中脂質へ及ぼす影響を検討した。海藻にはこれらの多糖類以外にも抗菌性物質や抗酸化性物質などが含まれている<sup>99-98)</sup>ため、海藻の摂取による影響が食物繊維によるものか、食物繊維以外の成分によるものか、あるいは両方の相乗作用なのか明らかにすることが必要であるが、本章ではまず、海藻多糖類（ラミナラン、アルギン酸、カラギーナンおよび寒天）のラット盲腸内フローラおよび血中脂質レベルに及ぼす影響を検討した。

#### 第1節

##### 海藻多糖類のラット盲腸内フローラおよび血中脂質レベルに及ぼす影響

本節では、ラミナラン、カラギーナン、寒天、通常の高粘度・高分子量のアルギン酸ナトリウム（HAG）および近年特定保健用食品として認可された低分子化アル

ギン酸ナトリウム（AG5）<sup>65)</sup>について、各多糖類を2%含有する食餌をラットに与え、盲腸内フローラ、盲腸内短鎖脂肪酸（SCFAs）および血清脂質レベルに対する影響を調べた。

#### 実験材料および方法

##### 食餌

前章と同様に Table 14 に示した組成からなる、準精製飼料をコントロール食とし、これにラミナラン（東京化成）、カラギーナン（東京化成）、寒天（極東製薬）、高粘度・高分子量のアルギン酸ナトリウム（HAG, 1% 溶液で粘度 500 ~ 600 cp; 和光純薬）または低粘度・低分子量のアルギン酸ナトリウム（AG5, 1% 溶液で粘度約 1.5 cp; ソルギン<sup>TM</sup>, 共成製薬）<sup>63)</sup>を2% (w/w) 含有する食餌を調製した。

##### 動物実験

1 回の実験で4週齢の雄性 Wistar 系ラット（日本クレア）16匹または12匹を用い、前章と同様に各群4匹ずつにコントロール食または試験食を7日間摂取させた。実験期間中の体重増加量および糞便重量を観察し、実験最終日にエーテル麻酔下で腹部大動脈から全採血し致死させ、盲腸重量、盲腸内容物の重量および肝臓重量を測定した。盲腸内容物は盲腸内 pH、盲腸内アンモニア濃度および盲腸内フローラの分析に速やかに供した後、SCFAs の分析を行うまで -20℃ で凍結保存した。血清中脂質についても前章と同様に調べた。

##### 化学分析

盲腸内 pH、アンモニア濃度および盲腸内フローラは前章と同様に測定した。盲腸内短鎖脂肪酸（SCFAs）は盲腸内容物を5倍量の脱イオン水に懸濁した後、HPLC を用いて第1章と同じ条件で、乳酸、酢酸、プロピオン酸および *n*-酪酸の分析を行った。血清中のトリグリセリド（TG）、総コレステロール（TC）および遊離脂肪酸（NEFA）については前章と同様に、高密度リポタンパク質コレステロール（HDL）については HDL-コレステロール-テストワコー（和光純薬）を用いて測定した。



## 結 果

### 体重、糞便、盲腸および肝臓重量

各海藻多糖類 2% を含有する食餌を 7 日間投与したラットの体重増加量、糞便重量、盲腸重量および肝臓重量を測定した結果を Fig. 21 に示した。

各多糖類とも体重増加量に対し有意な影響は及ぼさなかった。

カラギーナンおよび寒天食群において糞便重量がそれぞれコントロール食の約 6.6 倍および 4.2 倍に増加した。HAG 食でも有意差はなかったがコントロール食の約 2.5 倍の値であった。

盲腸重量（内容物を含む）は低分子量のアルギン酸ナトリウム（AG5）およびラミナランによりそれぞれコントロール食の約 2.6 倍および 1.8 倍に増加し、通常の高分子量のアルギン酸ナトリウム（HAG）場合、有意な差ではなかったが約 1.8 倍の値であった。カラギーナンでも有意に増加したが、コントロール食に対し 1.3 倍程度であり、寒天による盲腸重量の変動は認められなかった。HAG および AG5 では盲腸壁重量が有意に増加していたが、盲腸壁と盲腸内容物の重量比は各試験食群で 1:8 ~ 1:14 であった。

肝臓重量は寒天および AG5 の摂取によりそれぞれコントロール食の 9% および 8% 程度減少する傾向を示したが有意な差ではなかった。

### 盲腸内 pH、アンモニアおよび SCFAs

盲腸内 pH、アンモニアおよび SCFAs の濃度を測定した結果を Fig. 22 に示した。

盲腸内 pH はラミナランおよび AG5 により明らかに低下しており、それぞれコントロール食より 約 0.9 および 1.1 低い値であった。一方、カラギーナンおよび寒天により有意に上昇し、コントロールより 約 0.6 高い値を示した。

盲腸内アンモニア濃度は寒天により減少（コントロール食に対し 約 1/2）する傾向を、AG5 により増加（コントロールの約 1.8 倍）する傾向を示した。

盲腸内の短鎖脂肪酸（SCFAs）はラミナランにより増加し、特にプロピオン酸および *n*-酪酸濃度がコントロール食の 2.1 倍および 2.3 倍に増加した。カラギーナン、寒天および AG5 では酢酸およびプロピオン酸濃度が 1/2 以下に減少した。特に AG5 では *n*-酪酸濃度も有意に減少していた。なおデータは示していないが、内

部標準として用いたクロトン酸のクロマトグラフ上のピークはラミナラン食以外の検体においてコントロール食より小さかった。

### 血清脂質

血清脂質を調べた結果を Fig. 23 に示した。血清 TG および血清 TC は AG5 により有意に抑制され、それぞれのコントロール食に対する減少率はそれぞれ 約 47% および 27% であった。カラギーナン、寒天および HAG 食においても血清 TG が抑制される傾向を示したが、有意な差ではなかった。本実験の測定項目の血清脂質レベルに対してラミナランの摂取による抑制は認められなかった。その他の多糖類も血清 NEFA および血清 HDL-コレステロールに対する影響は認められなかった。

### 盲腸内フローラ

盲腸内フローラを調べた結果を Fig. 24, 25 に示した。Enterobacteriaceae 菌数はカラギーナンによりコントロール食（ $10^{9.2}$ /g 内容物）の約 50 倍に増加し、一方で、寒天によりその菌数は 約 1/160 に減少した。Staphylococci はラミナラン食において検出されず、また AG5 およびカラギーナン食により有意に減少した。寒天は peptococcaceae を減少させた。ラミナランの摂取により bifidobacteria および lactobacilli 菌数は有意な差ではないが増加の傾向を示した。低分子量のアルギン酸ナトリウム（AG5）により bifidobacteria および lactobacilli 菌数は増加の傾向を示したが、通常の高分子量のアルギン酸ナトリウム（HAG）ではコントロール食と比較して変動は認められなかった。ビフィズス菌占有率はラミナラン、AG5 および寒天により増加する傾向を、カラギーナンにより減少する傾向を示した。

## 考 察

本実験において各海藻多糖類の摂取はラット盲腸内フローラおよび血清脂質に対して異なった影響を及ぼした。

ラミナランと低分子量アルギン酸ナトリウム（AG5）は同様に盲腸重量、特に盲腸内容物を増加させる（Fig. 21）こと、盲腸内 pH 値を低下させること、および糞便重量には大きな影響を及ぼさないことなどから、摂取された量のかなりの部分がラット盲腸内フローラにより利用資化されたと考えられる。これらの発酵性の強い多糖類よりも、その他のカラギーナン、寒天、通常の高粘度のアルギン酸ナトリウ



ム (HAG) の方が膨潤性ははるかに大きい、盲腸重量の増加は発酵性多糖類ほどは顕著ではなかった。盲腸重量や大腸重量の増加はその原因や作用機序は未だ明らかにされていないが、発酵性の食物繊維や難消化性のオリゴ糖が、血中コレステロール値の抑制や他の有用な作用を及ぼす際の条件のひとつであると示唆され興味を持たれている<sup>103)</sup>。

一方、紅藻多糖類のカラギーナンおよび寒天では糞便重量が増加し、盲腸内 pH 値は上昇した。前章考察でも述べたように腸内 pH が上昇するとアンモニアなどの腐敗産物が腸管から吸収されやすくなることや、酸性 pH 条件下では腐敗産物が生成されにくいことなどから、腸内の pH は低いほうが望ましいとされている<sup>91-94)</sup>。盲腸内 pH の上昇は 9 種類の海藻について検討した前章の実験では、緑藻類のアオリおよびアオサをラットに摂取させた場合にもみられたが、この 2 つの海藻は試験を行った海藻のうちそれぞれの試験において、最も大きい糞便重量の増加を示した (Fig. 9)。カラギーナンおよび寒天もアルギン酸と比較してもより顕著に糞便重量が増加していたため、盲腸内 pH の上昇と過度の糞便排泄量の増加は相関性を持つ可能性がある。

上述したように、発酵性の食物繊維による血中 TC 抑制作用に、腸内フローラによる短鎖脂肪酸 (SCFAs)、とくにプロピオン酸の生成が関与する可能性が最近報告されている<sup>51-53)</sup>。盲腸内の遊離 SCFAs 濃度がカラギーナンおよび寒天食群で減少していたことは、その膨潤性や糞便排泄量の増加により希釈されたためと考えられるが、粘性の低い AG5 でも盲腸内の pH 低下が示されたにもかかわらず、遊離の SCFAs 濃度が低下していた (Fig. 22)。その原因として盲腸内容物の重量増加による希釈効果が挙げられるが、AG5 の場合、その重量増加自体が腸内フローラによる発酵の結果によるものと考えられる。その他の原因として SCFAs は pH が酸性側では速やかに腸管から体内に吸収される<sup>104)</sup> ことが考えられる。また、本研究で用いた AG5 は *in vitro* において酢酸による pH 低下に対して緩衝能を持ち (Fig. 26 A)、AG5 自体の pH が約 6.0 であるのに pH 約 6.2 のラット盲腸内容物懸濁液が AG5 の存在により約 6.6 まで上昇する (Fig. 26 B)。このことから盲腸内において SCFAs がある程度は AG5 に化学的に結合、あるいは立体的に取り込まれていることが考えられる。

渡辺ら<sup>105)</sup> は平均分子量 1 万のアルギン酸ナトリウムではコレステロール排泄能は見られないものの、AG5 (平均分子量 5 万) が通常 (高粘度) のアルギン酸ナトリ

ウムと同様にコレステロールの排泄を促進することを報告しており、また、その排泄能はより分子量の高い (約 10 万) アルギン酸ナトリウムがより強いことを示している。しかし、本実験では HAG (分子量約 270 万) よりもはるかに分子量の小さい AG5 の方がラット血清中の TG および TC を顕著に抑制した (Fig. 23)。このことは AG5 による盲腸内における発酵、あるいは pH の顕著な低下と相関があると推察される。しかし、ラミナランは *in vitro* の実験 (Table 4~8) でアルギン酸よりも強い発酵性を示し、AG5 と同様にラット盲腸内 pH を顕著に低下させ、さらに盲腸内のプロピオン酸および酪酸の濃度も有意に増加させることが示されたが、血清脂質レベルには明確な影響を及ぼさなかった。これらのことから AG5 はコレステロールや胆汁酸などの排泄促進効果と、盲腸内での発酵性との相加的あるいは相乗の効果により、より胆汁酸排泄能の強い HAG やより発酵性の強いラミナランより明確にラット血清中の TG および TC 値を低下させたと考えられる。

各試験食間で bacteroidaceae や bifidobacteria などの優勢菌群に有意な差はみられなかったが、ラミナランおよび AG5 食群では bifidobacteria 菌数およびビフィズス菌占有率が高い傾向を示した (Fig. 24, 25)。Terada *et al.*<sup>106)</sup> も健常ヒトに分子量約 3 万のアルギン酸ナトリウムを 2 週間摂取させた場合、糞便中 (腸内) の bifidobacteria 菌数が増加したことを報告している。Salyers *et al.*<sup>37-39)</sup> や本論文第 1 章の *in vitro* の実験結果 (Table 3) から、ヒト腸内菌の中で *Bacteroides* や *Clostridium* の一部の菌株はラミナランまたはアルギン酸ナトリウムを分解利用するが、*Bifidobacterium* はこれらの多糖類をほとんど利用できないと考えられる。しかし腸内の多糖類分解菌の作用によってオリゴ糖類が生成される場合、これを数種の *Bifidobacterium* が利用する可能性も考えられる。この点についてはヒト腸内の代表的なラミナラン分解菌である *Clostridium ramosum* を用いて第 5 章の *in vitro* の実験で検討する。一方、カラギーナンや寒天、また HAG もラミナランや AG5 と比べ、腸内フローラによる分解作用を受けにくい、あるいは短期間の摂取ではほとんど分解作用を受けないことから、*Bifidobacterium* に利用されるオリゴ糖の生成も起こりにくいと考えられる。

カラギーナンの摂取により盲腸内の enterobacteriaceae が増加し、一方、寒天の摂取により減少した。これらの多糖類は両方とも紅藻類の多糖類であるが、この変動以外にはラットに対して糞便重量の増加、盲腸内 pH の上昇などほぼ同様な影響を示した。Enterobacteriaceae の腸内での増加および減少の要因はこれまで得た



知見からは説明できないが、増粘剤として同じ目的で食品に添加されるこれらの多糖類が衛生指標菌や、食中毒菌とも関連しているこの菌群に対し、全く異なった作用を示したのは興味深い重要な知見である。Enterobacteriaceae が宿主にとってどのような働きをするのか、また有用か有害であるかなどについては長年議論されている。例えば腸内で腐敗物質を作り出すことでは有害とされるが、ビタミンの合成や感染症に対する防御などを担う有用な点もあることが知られている<sup>25-28)</sup>。

海藻多糖類を含め、食物繊維は一般的に便容量を増加し、脂質の過剰な取り込みや腸内腐敗物の生成を抑制することが知られているが<sup>87)</sup>、本実験の結果は、異なった海藻多糖類は腸内フローラや血中脂質に対してそれぞれ異なった影響を与えることを示した。特に、粘性が低く従来はほとんど食品に利用されなかったラミナラン、および特定保健用食品として開発された低分子量アルギン酸ナトリウムなどの発酵性の海藻多糖類が、盲腸内 pH の低下やビフィズス菌占有率の増加など、腸内環境を改善する可能性を示唆したことは注目に値すると考えられる。これら有用な影響を示した発酵性多糖類については、実際にヒトの摂取する範囲内の量での影響や、過剰摂取した際の影響を検討する必要がある。次節ではこの点について考慮し、ラットに及ぼす影響の濃度依存性について検討した。

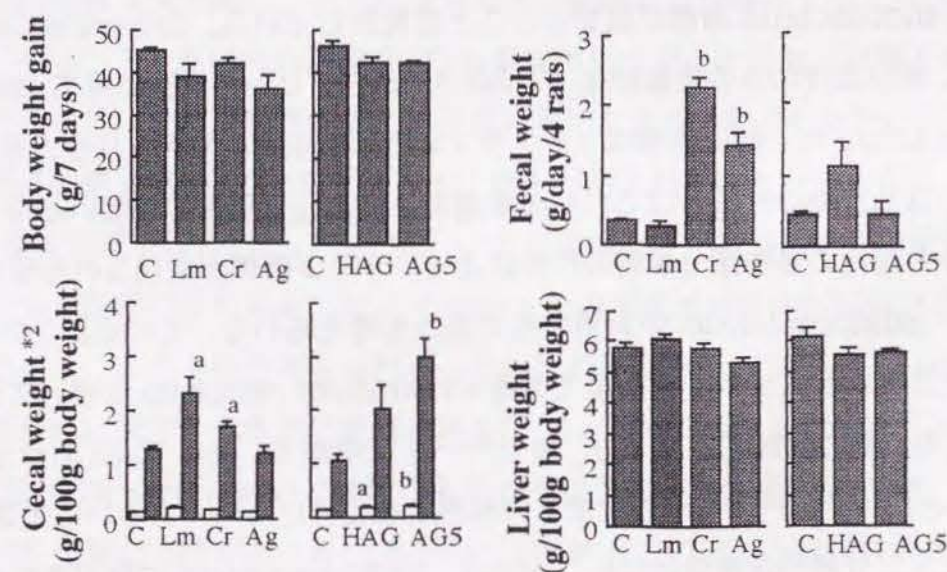


Fig. 21 Effect of diets containing 2% algal polysaccharides on weights of body, feces, cecum and liver in rats

The rats were grouped (4 rats per group) and fed the following diet: Control diet (C), diet containing 2% laminaran (Lm), carrageenan (Cr), agar (Ag), high viscous sodium alginate (HAG) and low viscous sodium alginate (AG5).

Vertical bars represent the standard error of the mean.

\*1 Significant difference from the control: a  $p < 0.05$ , b  $p < 0.01$ .

\*2 □ ; cecal wall weight, ■ ; cecal content weight.

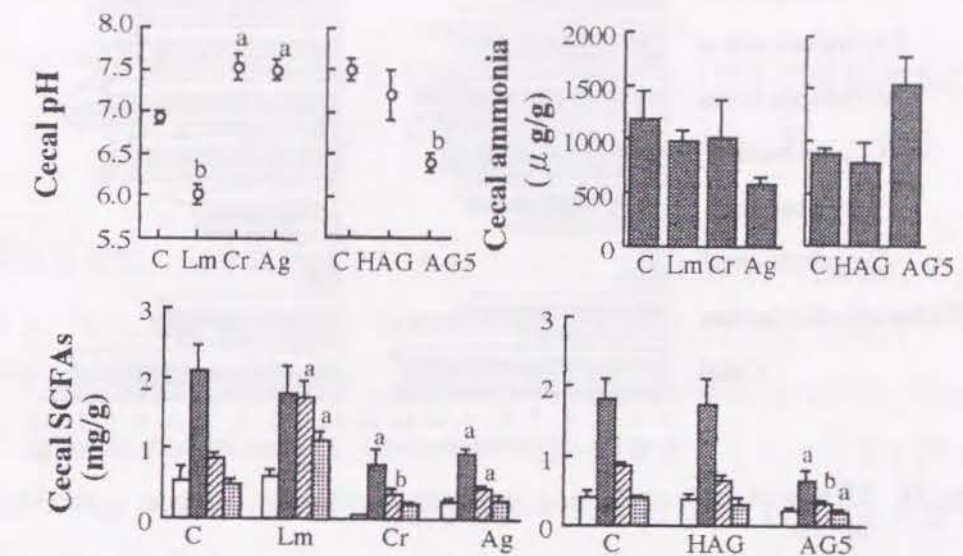


Fig. 22 Effect of diets containing 2% algal polysaccharides on cecal pH,  $\text{NH}_3$  and short-chain fatty acids in rats

See footnotes of Fig. 21.

SCFAs: short-chain fatty acids, lactic acid (□), acetic acid (■), propionic acid (▨) and *n*-butyric acid (▩).

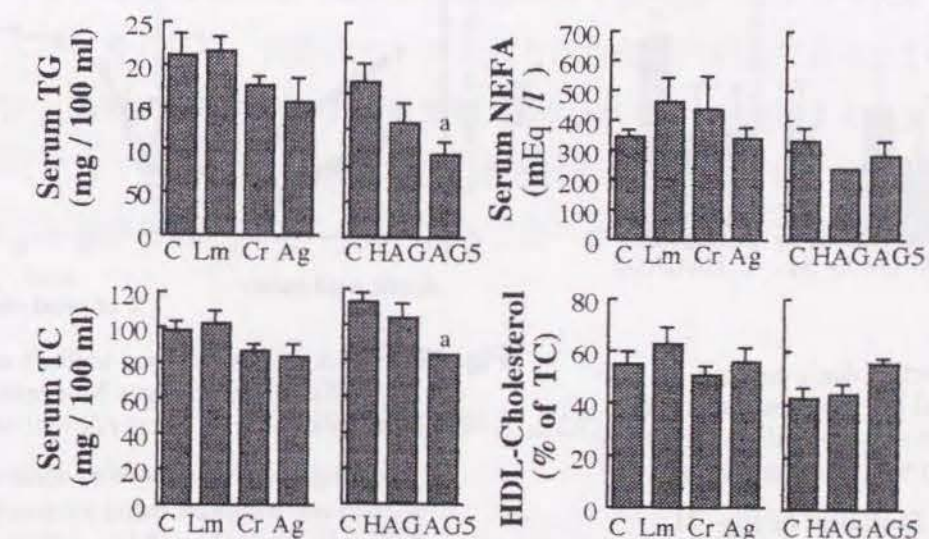


Fig. 23 Effect of diets containing 2% algal polysaccharides on levels of serum lipid in rats

See footnotes of Fig. 21.



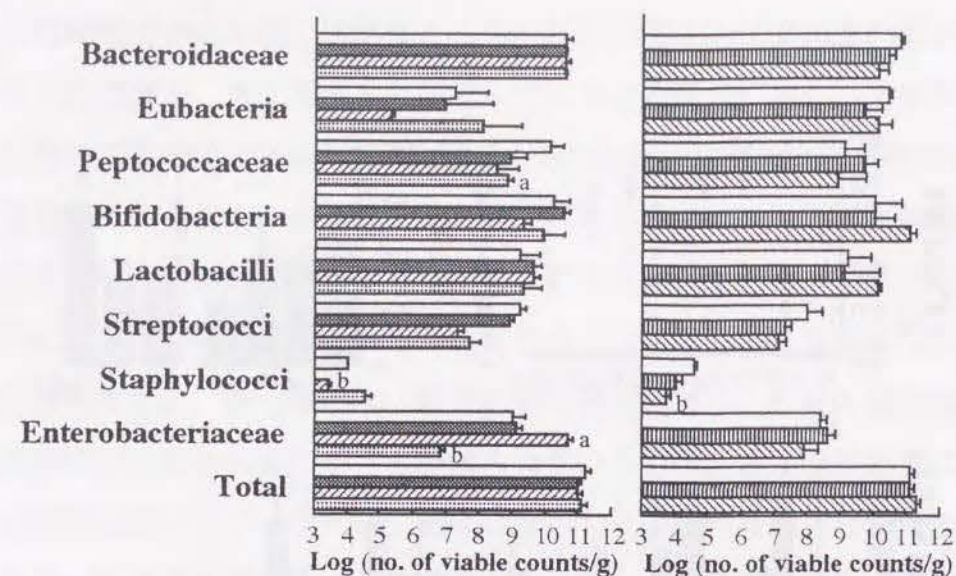


Fig. 24 Effects of diets containing algal polysaccharides on cecal microflora in rats

The rats were grouped (4 rats per group) and fed the following diets: Control diet; □, diet containing 2% laminaran; ▨, carrageenan; ▩, agar; ▤, high viscous sodium alginate (HAG); ▦, and low viscous sodium alginate (AG5); ▧. Horizontal bars represent the standard error of the mean.

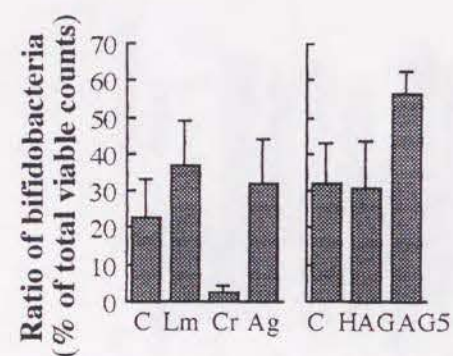


Fig. 25 Effect of diets containing 2% algal polysaccharides on the ratio of cecal bifidobacteria to total viable counts in rats.

See footnotes of Fig. 21.

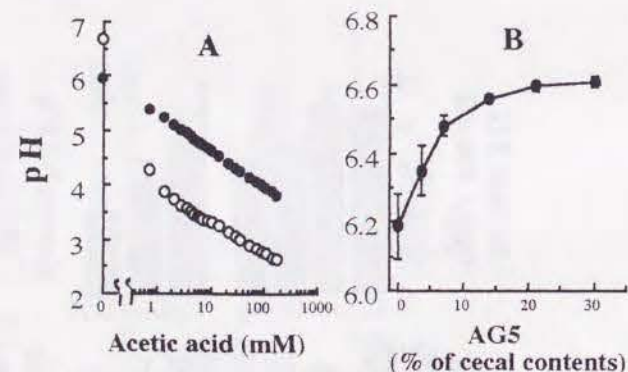


Fig. 26 Effect of low viscous sodium alginate (AG5) on pH changes by acetic acid and pH value of cecal content solution

A pH changes of AG5 solution by acetic acid.  
○ 0.625 mM phosphate buffer solution (PB)  
● PB + 12.5% AG5  
B pH changes of rat cecal content solution by AG5 *in vitro*.  
Seven to 60 mg AG5 were added into 2 ml of 10% cecal content solution. Vertical bars represent the standard error of the mean (n = 3).

## 第2節

### ラミナランおよび低分子量アルギン酸ナトリウムの混餌濃度のラット盲腸内フローラおよび血中脂質レベルに及ぼす影響

前節で5種類の海藻多糖類2%食をラットに与えた場合、褐藻類中の多糖類のラミナラン、および低分子量アルギン酸ナトリウム (AG5) が、盲腸内フローラによって資化 (盲腸内 pH の低下 (Fig. 21), 盲腸内容物重量の増加 (Fig. 22)) されることが示され、また bifidobacteria の菌数、およびその占有率が増加する傾向を示した (Fig. 25)。これらの多糖類は第1章の *in vitro* における実験でもヒト腸内フローラにより発酵されることが示されている (Table 4)。また、ラットの血中脂質レベルについては、AG5 の摂取により有意にトリグリセリド (TG) および総コレステロール (TC) が抑制された。

これら発酵性の海藻多糖類の腸内フローラのバランスに与える影響は宿主に対して有用であり、また血中脂質に与える AG5 の影響は、成人病の大きな因子となる高脂肪、高タンパク質の傾向の食餌を摂取している現代の先進国のヒトにとって有用な影響であると考えられる。これらの影響は投与量の違いにより与える影響も異なってくると考えられ、実際にヒトが摂取可能な範囲内の量で有効性があるのか、また逆に、過剰摂取によって有害な影響が現れないのかを検討する必要がある。そこで本節では、ラミナランおよび AG5 をそれぞれ 0.4% ~ 8% および 0.4% ~ 10% 含有する食餌をラットに与え、盲腸内フローラおよび血中脂質等に及ぼす影響を調べた。

### 実験材料および方法

前節までと同様に Table 14 に示した組成からなる精製飼料をコントロール食とし、これに 0.4, 2.0 または 8.0% (w/w) のラミナランを含有する食餌、また 0.4, 2.0 または 10% の低分子量アルギン酸ナトリウム (AG5) を含有する食餌を調製した。

1 回の実験で 4 週齢の雄性 Wistar 系ラット (日本クレア) 16 匹を用い、第 2 章



と同様に各群 4 匹ずつに分け、コントロール食または試験食を 7 日間摂取させ体重、糞便重量、盲腸重量、肝臓重量、盲腸内 pH、盲腸内アンモニア濃度、血漿脂質等および盲腸内フローラを調べた。

本実験では血液の遠心分離の際、前節までのセパラビットに置き換え、1 検体（約 2 ml）当たり 20  $\mu$ l のヘパリンナトリウム（10,000 単位/5ml、清水製薬）を用い分離した血漿を実験に供した。

## 結 果

### 体重、糞便、盲腸および肝臓重量

実験期間中のラットの体重増加量、糞便重量、実験終了後の盲腸重量および肝臓重量を測定した結果を Fig. 27 に示した。

8.0 % ラミナランおよび 10 % AG5 食群においては摂取 3 日目から下痢状の糞便を排泄し、正確な排泄量を測定することはできなかったが、回収できた量だけを秤量した。この高用量の摂取群ではコントロール食と比較して体重増加量が有意に減少しており、それぞれ 13% および 24% 小さかった。0.4% および 2.0% 食群では体重および糞便重量に大きな変化は認められなかった。

各多糖類とも体重当たりの盲腸重量（内容物を含む）を濃度依存的に増加させ、それぞれ 2.0% 食群においてコントロール食群の 2.3 ~ 2.4 倍で、ラミナラン 8.0% および AG5 10% 食群においてはそれぞれ 3.5 および 2.6 倍の重量であった。各多糖類とも 0.4% 食では有意差はないがそれぞれコントロール食の約 1.6 倍の重量であった。

肝臓重量は AG5 により濃度依存的に減少し、体重当たりの肝臓重量が 2.0% および 10% 食でそれぞれコントロール食の 6.0% および 20% 減少した。ラミナランでも 2.0% および 8.0% 食により減少の傾向が示されたが有意な差ではなかった。

### 盲腸内 pH、アンモニアおよび血漿脂質

各多糖類のラット盲腸内 pH、アンモニアおよび血漿脂質レベルに及ぼす影響を調べた結果を Fig. 28 に示した。

盲腸内 pH 値は各多糖類により低下した。特にラミナランの場合、低濃度 0.4% でも有意に（コントロール食より 1.0）低下し、2.0% 食ではコントロール食より約

1.6 低下し、最も低い値を示した。AG5 でも 2.0 % 食により最も低い（コントロール食より約 0.8）値を示した。

盲腸内のアンモニア濃度は 8.0% ラミナラン食によりコントロール食群の 62% まで減少し、また、AG5 10% 食群でもその差は小さい（コントロール食の 9%）が減少する傾向を示した。

血漿の TG レベルはラミナラン 0.4%, 2.0% でも抑制される傾向を示したが、AG5 によって同じ濃度でも有意に抑制され、それぞれコントロールの 66% であった。各多糖類とも高用量の摂取（8.0%, 10%）では TG 濃度がコントロールの 1/3 程度と顕著に抑制された。血漿 TC は AG5 食により約 20% 程度抑制されたが、ラミナラン食による影響は認められなかった。TC に対する高密度リポタンパク質コレステロール（HDL）の割合（HDL%）は 8.0% ラミナラン および 0.4% AG5 食により有意に増加したが、10% AG5 食により減少した。血漿 NEFA は誤差が大きく有意差は得られなかったが、2.0 および 8.0 % ラミナラン食で増加する傾向を、10 % AG5 食で減少する傾向を示した。

### 盲腸内フローラ

盲腸内フローラを調べた結果をラミナランについては Fig. 29 に AG5 については Fig. 30 に示した。総生菌数および最優勢菌である bacteroidaceae に大きな変動は認められなかったが、ラミナラン食においてわずかに増加する傾向であった。ラミナラン、AG5 とともに bifidobacteria の菌数を増加させる傾向を示した。また、その菌数およびビフィズス菌占有率は各多糖類とも 0.4 % 食で最も高い数値を示したが、8.0% ラミナラン食におけるビフィズス菌占有率はコントロールよりも低い傾向であった。Lactobacilli は AG5 食により増加する傾向であった。ラミナランによる Lactobacilli の増加は認められなかったが、この実験ではコントロール食群においても高い Lactobacilli 菌数（ $10^{10}$ /g）を示していた。Staphylococci は 2.0% ラミナラン食において 4 検体中 3 検体からは検出されず、また、0.4% AG5 食においても菌数が減少した。8.0% ラミナラン食により enterobacteriaceae が有意に増加し、streptococci が増加傾向を示した。Eubacteria および peptococcaceae の菌数は試験食によって低い平均値を示したが有意な差は得られなかった。



前節の実験結果から既に、ラミナランおよび低分子量アルギン酸ナトリウム (AG5) のそれぞれの2%食は、盲腸内 pH の低下 (Fig. 22) や bifidobacteria 菌数およびその占有率の増加の傾向 (Fig. 24, 25) など、腸内環境の面から有用であることが示されているが、本節の実験においてはそれぞれより低い混餌濃度 (0.4 %w/w) でもこれらの有用な影響が示された。

排泄された糞便の状態から、これらの多糖類の摂りすぎ (8 または 10 % w/w) は、下痢様の症状を引き起こすため注意を要すると考えられた。腸内のビフィズス菌を活性化することで特定保健用食品として認可されているフラクトオリゴ糖やその他のオリゴ糖類なども、摂りすぎによる下痢の症状があることは確認されており、容器等にもその旨が表示されている。本実験で見られたラットの下痢様の症状も腸内フローラによる過発酵、つまり有機酸の過剰の生成による酸性下痢症であると考えられる。

各多糖類とも盲腸重量を濃度依存的に増加させたが、前節の結果とあわせると、盲腸内容物の重量が大きく増加したと考えられる。ラミナランおよび AG5 は膨潤性や粘性が極めて小さいため、腸内発酵性のオリゴ糖と同様に盲腸内で生成された有機酸、pH の低下あるいは腸内菌の活性化などが盲腸重量の増加と深く関連していると考えられる。しかし、前節考察でも述べたように発酵性の食物繊維 (オリゴ糖を含む) の摂取による盲腸重量の増加は、多くの研究者によって報告され注目されている<sup>103)</sup> もの、その作用機序および盲腸重量が増加することの生理的な意義はまだ明らかではない。盲腸組織自体の重量にほとんど変化がないとしても、その内容物の重量が増加していることから、盲腸組織自体に内容物の許容量を変動させるように生理的に大きな影響を及ぼしている可能性が考えられる。これを解明するには腸内微生物フローラの菌体そのものの他に、その生成物、特に短鎖脂肪酸が盲腸組織細胞に対してどのような影響を直接及ぼすのか、あるいは間接的にどのようなシグナルを伝達させるのかを詳細に検討する必要があると考えられる。最近、これらの点について Cambell et al<sup>103)</sup> や他の栄養、生理あるいは医学者らにより研究が始められており、その研究成果は本研究の実験結果と深く関わってくると思われる。

Bifidobacteria の菌数や占有率の結果からみると、各多糖類とも 0.4 % という低

用量で腸内フローラのバランスを改善することが示唆された。また、下痢を起こすほどの高用量の多糖類の摂取でも、盲腸内フローラに対しては staphylococci の減少およびラミナランによる enterobacteriaceae の増加以外に大きな変動は認められなかった。ラミナラン 8.0% 食では bifidobacteria 菌数の増加傾向にも関わらずその占有率は減少の傾向であったが、これは最優勢菌群である bacteroidaceae の増加傾向や、enterobacteriaceae の有意な増加によるものと考えられる。この場合、enterobacteriaceae 菌数は bacteroidaceae の次に多い  $10^{10.3}$ /g 内容物であり、一方 0.4 および 2.0% 食では bifidobacteria が最優勢あるいは2番目に優勢な菌群であった。

ラミナランおよびアルギン酸は褐藻類中の多糖類である。既に前章の実験で検討した9種類の海藻のうち6種類が褐藻類であるが、その結果はラット盲腸内フローラに対して低用量 (1 % 食) では、bifidobacteria 菌数およびその占有率の増加の傾向など有用な影響が示されたが、高用量 (5 % 食) では海藻種によって様々であり、bifidobacteria や lactobacilli も含めいくつかの菌群が抑制された (Fig. 17~20, Table 17)。前章考察でも述べたようにこれらの結果には海藻類中の食物繊維以外の栄養成分や生理活性物質が関与していると考えられる。この点については次章において、ラミナランおよびアルギン酸が相当量含まれていることが明らか (第1章第2節) なアラメについて検討する。

前節の結果と同様に本節においても、ラミナラン食では盲腸内 pH の顕著な低下が認められたものの、血漿コレステロール (TC) に変化はみられず、一方、2.0 % 以上の AG5 混餌濃度で血漿 TC は有意に減少した。高密度リポタンパク質コレステロール (HDL) は、高血圧、心臓疾患など高コレステロール血症関連の疾病に対して抑制的な効果を示し、いわゆる善玉コレステロールと呼ばれ TC に対する割合が高値であることが望ましいとされ<sup>107)</sup>、血中脂質改善の指標にもなっている。本実験においては 0.4% の AG5 食では増加し有用な影響を示したが、10 % 食では逆に減少した。コレステロールはもちろんのこと血中の脂質はプロゲステロン、コルチコステロイド、その他のホルモンの合成に必要で<sup>108,109)</sup>、生体にとって不可欠な成分である。そのため血中脂質の減少が一概に有用であるとはいえないが、わが国でも 1970 年前後の高度成長期以降、所得の増加、食事の欧米化や生活習慣の変容にともない脂肪摂取の過多や運動不足になりがちであり、また高脂質血症あるいはその予備段階の人口が急増している<sup>49)</sup>。そのため海藻あるいは海藻食物繊維を摂取する



目的として意図的に血中 TC を下げたいという場合が多い。本実験で用いた AG5 の場合も血中 TG および TC を減少させることから、高脂血症、高コレステロール症に対しては有用であることが示されたが、高用量 (10 % w/w) の摂取では HDL の割合の減少が示されたため注意を要すると考えられる。10% AG5 食の場合、下痢や体重増加の抑制などがみられるためさらに検討する必要があるが、脂質合成、代謝を行う重要な器官である肝臓の重量が有意に減少しており、血中脂質濃度の抑制との相関が考えられる。

健康成人の一日の食物繊維摂取量の目標摂取量は 20 から 25 g とされ、日本人の場合、この目標摂取量に 5 g 程度不足している<sup>11)</sup>とされている。そのため健康飲料あるいは特定保健用食品として、5 g 前後の食物繊維を含む商品が市販されている。本実験で有用性を示した食餌中に 0.4 ~ 2.0 % という濃度は、ラットが 1 日に体重の 1/10 の試験食を摂取するとして体重当たりに換算すると、20 ~ 100 g / 50kg / 日とかなりの量になる。しかし、食物繊維の摂取量は体重当たりの摂取量ではなく、その他の栄養成分、特に脂質やタンパク質の摂取量とのバランス<sup>11)</sup>から考慮した方が妥当であると考えられている。従って、水以外の全摂取量に対する食物繊維の重量として考えると食餌中に 0.4 ~ 2.0% という濃度はヒトに換算して約 2 ~ 10 g / 日 (四訂食品成分表、日本人の摂取栄養量<sup>110)</sup>による摂取量から換算) に相当し、通常の摂取量の範囲である。一方、これまで多くの研究者により 5 ~ 20% もの食物繊維を含む食餌をラットに投与した場合の影響が報告されているが、その高用量の摂取の影響がヒトの場合でも起こりうる影響なのかは検討する必要があると思われる。

実際にヒトでの影響を確かめる必要はあるが、以上の結果からラミナラン、AG5 ともヒトが無理なく摂取できる用量の範囲で、盲腸内 pH の低下、bifidobacteria 菌数およびその占有率の増加など腸内環境、また腸内環境を介して健康に有用な効果をもたらすことが期待できる。

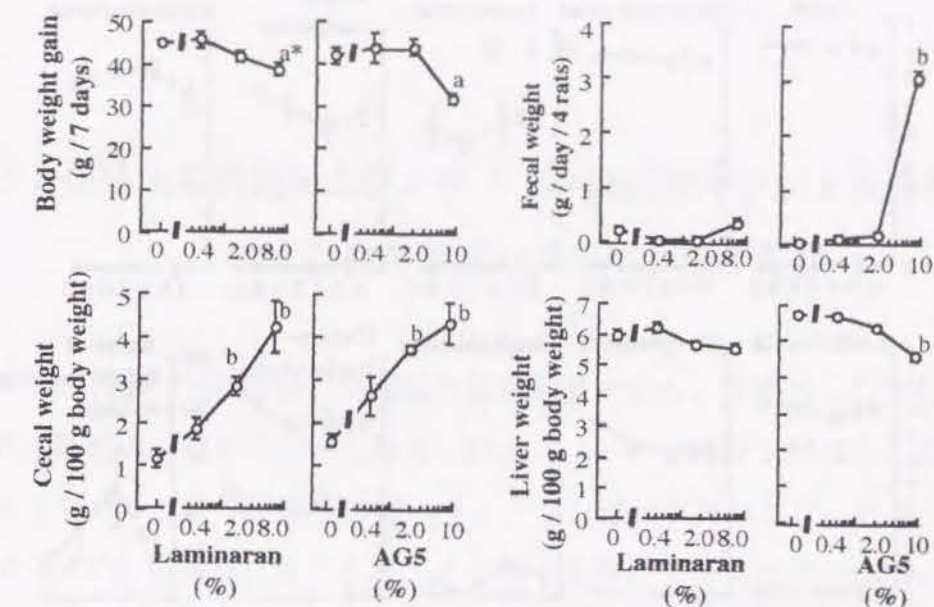


Fig. 27 Effect of diets containing laminaran or low viscous sodium alginate (AG5) on weights of body, feces, cecum and liver in rats

Rats were grouped (4 rats per group) and fed the control diet (C), diet containing 0.4 to 8 or 10% laminaran or low viscous sodium alginate (AG5; 1.5 cp at 1 % solution). Vertical bars represent the standard error of the mean.

\* Significant difference from the control: a  $p < 0.05$ , b  $p < 0.01$ .

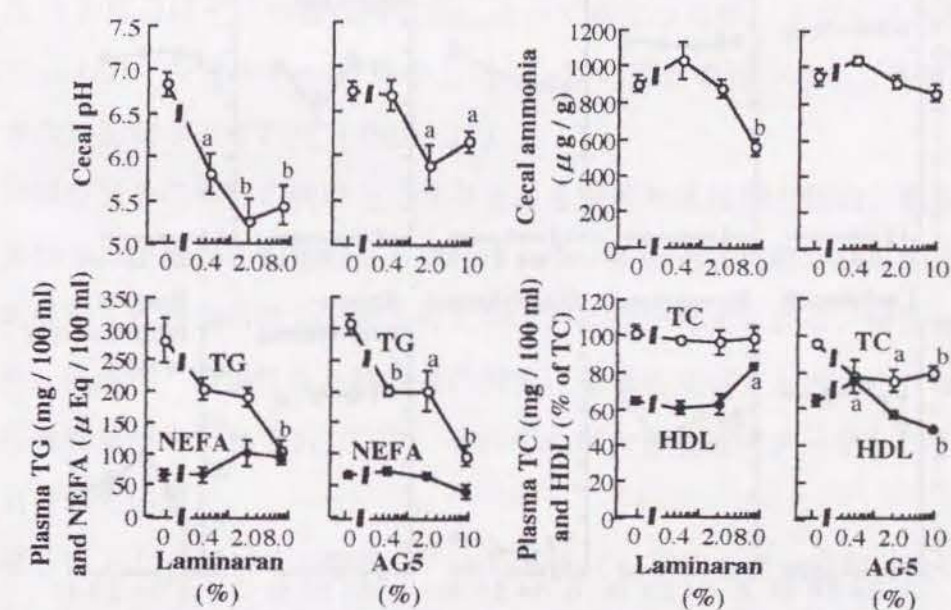


Fig. 28 Effect of diets containing laminaran or low viscous sodium alginate (AG5) on cecal pH, ammonia and levels of plasma lipid in rats

See footnotes of Fig. 27. TG; triglycerides, NEFA; free fatty acids, TC; total-cholesterol, HDL; high density lipoprotein cholesterol.



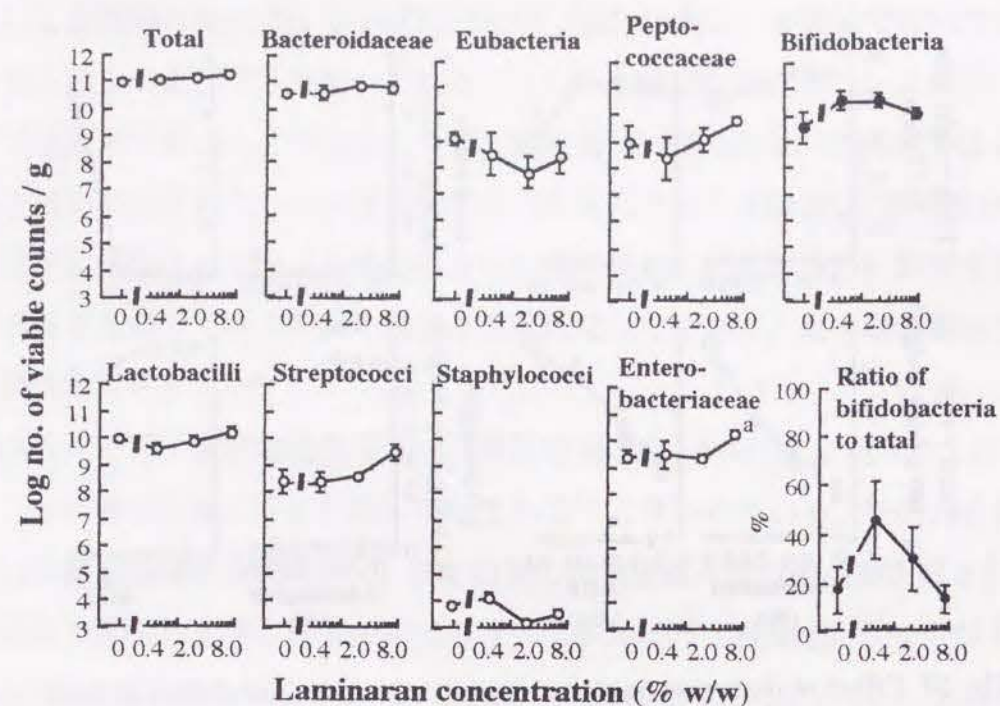


Fig. 29 Effects of laminaran on cecal microflora in rats

See footnote of Fig. 27.

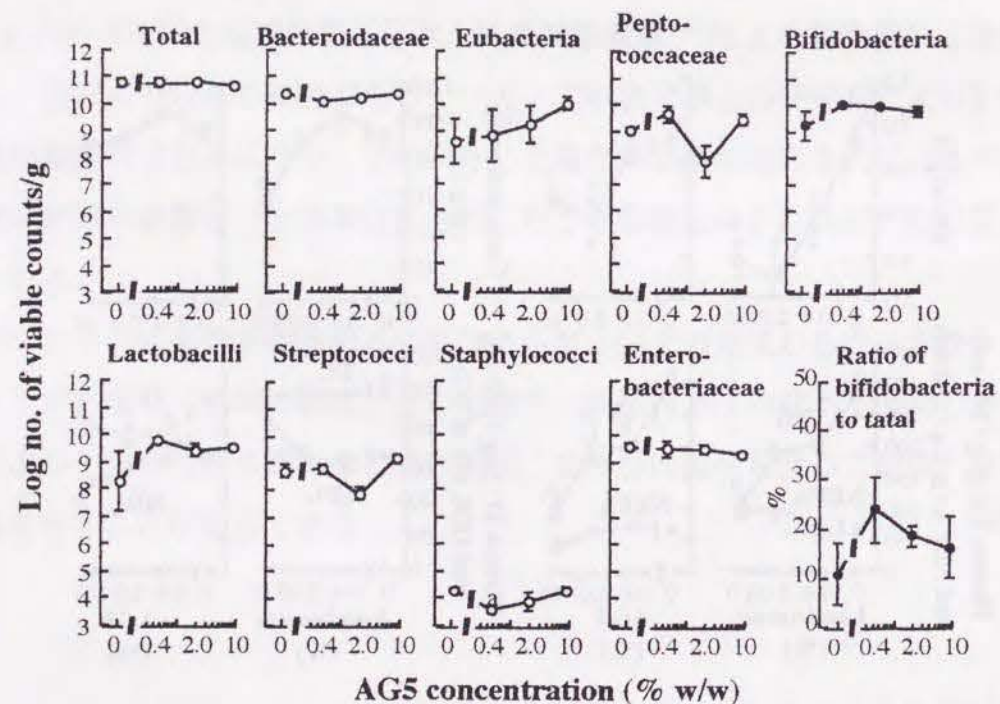


Fig. 30 Effects of low viscous sodium alginate (AG5) on cecal microflora in rats

See footnotes of Fig. 27.

#### 第4章

### アラメ粗抽出多糖類およびメタノール抽出物のラット盲腸内フローラ および血中脂質レベルに及ぼす影響

第1章の実験で22種類の褐藻類の乾燥製品中から、粗抽出した水溶性（発酵性）の多糖類の回収率を調べた結果（Fig. 3, 5），アルギン酸は全ての製品に相当量含まれており，より発酵性の強いラミナランはヒダカコンブ，ヒダカ根コンブおよびアラメの3種類から検出され，その中でも特にアラメに10.9%（w/w）と最も多く含有されていることが示された．また，第3章の海藻多糖類5種類をラットに投与した実験ではラミナランおよび低分子量アルギン酸ナトリウム（AG5）が，盲腸内フローラに対して bifidobacteria の菌数やその占有率を増加させ有用な影響を持つことが示された．一方，第2章で6種類の褐藻類の乾燥粉末そのものをラットに与えた場合，1%（w/w）食の場合はラミナランやAG5と同様に bifidobacteria の菌数やその占有率の増加傾向などの有用な影響が示された．しかし，より高用量の5%食の場合はその影響は海藻種によって異なったが，メカブ以外の褐藻類では bifidobacteria や lactobacilli を含むいくつかの菌群の減少など，多糖類だけでは説明できない影響が示された（Table 17）．

この褐藻類そのものの摂取と，含有される発酵性多糖類の摂取の影響の相違から，多糖類抽出操作の前処理として行うメタノール処理で除かれる抽出液に，これらの乳酸菌を抑制する成分が含まれている可能性が考えられる．海藻中には抗ウィルス性，抗菌性，凝集性など腸内菌の発育に影響を及ぼすと考えられる多種多様な生理活性物質が含まれており<sup>96-98)</sup>，それぞれが大きな研究テーマとしてとりあげられ注目されている．

海藻5%という量は其の膨潤性<sup>97)</sup>から考えて日常的な摂取量ではないと思われる．しかし，最近では健康食品などとして海藻エキスや部分精製品が商品化されており，これらを成人病予防などの意図を持って摂取する場合には，海藻5%に相当する食物繊維あるいはその他の成分の摂取は日常的に摂取し得る量であり，その影響についても十分検討する必要がある．



そこで本章では食物繊維およびそれ以外の成分の影響について検討するため、アルギン酸およびラミナランが相当量含まれていることが示されたアラメについて、乾燥粉末そのもの、粗抽出した多糖類画分およびメタノール抽出物をラットに摂取させ、盲腸内フローラおよび血漿脂質レベルに及ぼす影響を調べた。

## 実験材料および方法

### 実験 1

#### 食餌

第 1 章第 2 節と同様に Fig. 2 に示す分画法に沿ってアラメから 0.1 N 塩酸画分 (F1: 粗ラミナラン), 1% 炭酸ナトリウム画分 (F2: 粗アルギン酸) および不溶性画分 (F3) を粗抽出した。第 2 章と同様に Table 14 に示した組成からなる準精製飼料をコントロール食とし、これにそれぞれ乾燥アラメ 5% に相当 (アラメからの回収率 (Fig. 3)  $\times$  5%) するように、すなわち 5% (w/w) アラメ粉末, 0.75% F1, 2.2% F2 および 1.5% F3 を含む食餌を調製した。

#### 動物実験

4 週齢の雄性 Wistar 系ラット (日本クレア) 20 匹を、第 2 章と同様に無作為に各群 4 匹ずつ 5 群に分けた。2 日間コントロール食を与えた後、コントロール食または試験食をラットに 7 日間摂取させた。投与期間中の体重および糞便重量、投与終了後の盲腸重量、肝臓重量、盲腸内容物の pH および アンモニア濃度、血漿トリグリセリドおよびコレステロール、および盲腸内フローラなどを前章までと同様に調べた。

### 実験 2

#### アラメ・メタノール抽出物

乾燥アラメ粉末に 2 倍量 (v/w) のメタノールを加え、3 h 攪拌した。多糖類の粗抽出の場合と同様に遠心分離し、上清をメタノール抽出液とした。in vitro の実験ではこの抽出液をそのまま培地に加えた。動物実験ではエバポレーター (50°C) で乾固後、エタノールで再溶解したものを試験食に加え、40°C で 1 晩乾燥した後、

実験に用いた。

#### 動物実験

4 週齢の雄性 Wistar 系ラット (日本クレア) 8 匹を用い、各群 4 匹ずつに分け、コントロール食、または 5% アラメに相当するメタノール抽出物を加えた試験食をラットに 7 日間摂取させ、上記と同様に盲腸内フローラ、血漿脂質レベルなどに及ぼす影響を検討した。

#### アラメ・メタノール抽出物の乳酸菌の in vitro での発育に及ぼす影響

上記メタノール抽出液を 1%, および発酵の指標として 0.5% グルコースを加えた 2 ml の GAM1/2 に、同じ培地で前培養した *Bifidobacterium bifidum*, *B. breve* および *Lactobacillus acidophilus* (乳製品由来) 混合培養液 50  $\mu$ l を接種し、スチールウール法で嫌気培養した。培養 3, 12, 24 および 48 h 後の培養液の濁度 (600nm) および pH を第 1 章と同様に測定した (n = 3)。対照として、メタノールを 1% 加えた培地を用い、同様の操作を行った。

## 結 果

#### 動物実験

動物実験の結果は実験 1 および実験 2 についてまとめて示した。

#### 体重、糞便、盲腸および肝臓重量

実験期間中のラットの体重増加量、糞便重量、実験終了後の盲腸重量および肝臓重量を測定した結果を Fig. 31 に示した。各試験食間で体重増加量に有意な差は認められなかった。

糞便重量はアラメ粉末 (A), F2 (炭酸ナトリウム画分; 主にアルギン酸) および F3 (難溶性画分) 食により有意に増加した。F1, F2 および F3 の摂取による糞便重量の増加量 (コントロールとの差) の和は 2.15 (g / 日 / 4 匹) であったのに対し、アラメ粉末食では 4.27 (g / 日 / 4 匹) であった。F1 (希塩酸画分; 主にラミナラン) 食では有意な差ではなかったがコントロール食の約 1.5 倍の糞便重量であった。メタノール抽出物 (M) による糞便重量の変化は認められなかった。

体重当たりの盲腸重量はアラメ粉末によりコントロール食の約 2 倍、F1 および



F2 によりそれぞれ約 1.5 倍に増加した。F3 による盲腸重量の増加は認められなかった。メタノール抽出物により増加の傾向（コントロール食の約 1.2 倍）であったが有意な差ではなかった。

体重当たりの肝臓重量は F3 によりコントロール食の 11% 減少した。アラメ粉末、F1、F2 およびメタノール抽出物による大きな影響は認められなかった。

#### 盲腸内 pH, アンモニアおよび血漿脂質レベル

Fig. 32 に盲腸内 pH, アンモニア濃度および血漿脂質レベルを調べた結果を示した。盲腸内 pH は F1 によりコントロール食より約 0.5 低下した。その他の試験食による大きな影響は認められなかった。

盲腸内のアンモニア濃度はアラメ粉末によりコントロールと比べ約 1/3 に減少し、F2 食でも有意な差ではないが減少する傾向で約 1/2 の値を示した。一方、F2 食により有意な差ではないが約 1.3 倍の濃度であった。F3 およびメタノール抽出物によるコントロールとの大きな差は認められなかった。

血漿トリグリセリド (TG) は F2 でも抑制される傾向であったが、その他の試験食で有意に減少した。特に F3 およびメタノール抽出物により、それぞれコントロール食の約 40% 低下した。血漿総コレステロール (TC) については有意差は認められなかったがアラメ粉末、F1 および F3 食によりそれぞれ約 2/3 に減少する傾向を示したが、F2 およびメタノール抽出物による抑制は認められなかった。

#### 盲腸内フローラ

盲腸内フローラを検索した結果を Fig. 33 に示した。アラメ粉末、各粗抽出多糖類および難溶性成分の摂取により bacteroidaceae が有意に増加（コントロール食の約 5 ~ 30 倍）し、総菌数も増加を示した。一方、メタノール抽出物によるこれらの菌数の増加は認められなかった。Eubacteria 菌数が F1, F2, F3 により増加する傾向であったが有意差は認められなかった。各粗抽出画分、特に F1 の摂取により bifidobacteria が有意に増加し（コントロール食の約 40 倍）、ビフィズス菌占有率も増加（2~3 倍）の傾向を示した。一方、有意差はないがメタノール抽出物により bifidobacteria 菌数は減少（約 1/50）の傾向を示し、アラメ粉末の摂取ではその菌数はコントロール食と大きな差はなく、わずかに減少の傾向であり、ビフィズス菌占有率もそれぞれ減少（1/10 および 1/3）の傾向を示した。また lactobacilli についても F1 食では増加が示されたが、メタノール抽出物によって減少の傾向であ

り、アラメ粉末の摂取では有意に減少した。さらに peptococcaceae 菌数も F1 食で有意に増加していたが、メタノール抽出物によって減少の傾向が示された。アラメ粉末および F1 により streptococci は有意に減少し、enterobacteriaceae は増加した。

#### アラメ・メタノール抽出物の *in vitro* での乳酸菌への影響

乳酸菌混合培養液の濁度および pH への影響を Fig. 34 に示した。対照の培養液と比較して、アラメ・メタノール抽出物により培養 12 h 後の濁度が抑制されたが、培養 36 および 48 h では対照と差はなかった。また、培養 12 h 以後の培養液の pH 低下が抑制されたが、12 h における対照との差（約 0.5）は 24 h および 36 h における差（それぞれ約 0.4 および 0.2）より大きかった。

## 考 察

本章では、第 2 章において試験食中に 5% という高用量の海藻食（褐藻類）でみられた、いくつかの菌群の抑制など、含有される海藻多糖類だけでは説明できない影響について検討することが目的であり、1% 食では bifidobacteria 菌数やその占有率が増加する傾向など、褐藻類中の発酵性多糖類であるラミナランや低分子量アルギン酸ナトリウム (AG5) の結果と一致する有用な影響を示すことは、既に第 2 章および第 3 章で述べたとおりである。

5% アラメ粉末をラットに投与した結果については、第 2 章におけるアラメの実験結果とほぼ一致していた。また、アラメから粗抽出した F1 は第 1 章第 2 節で示したとおり主な成分はラミナランである (Fig. 6) が、その摂取による影響は第 3 章のラミナラン精製品の場合とほぼ同様の影響を示した。一方、粗アルギン酸として抽出した F2 は高粘度のアルギン酸ナトリウム (HAG) または低粘度のアルギン酸ナトリウム (AG5) の両方、またはどちらかの結果と重なる点があった。

アラメ粉末の摂取による糞便重量の増加は、各粗抽出物による糞便重量の増加量の和よりも約 2 倍程度も大きく、水溶性および不溶性の各多糖類、あるいは多糖類以外の成分が相乗的に働くものと考えられる。また、細胞膜あるいは壁の形態を維持していることにより、生理的浸透圧まで平衡作用が働き大きな保水力につながることも考えられる。Suzuki et. al.<sup>87)</sup> は海藻粉末は乾燥重量の約 10 から 20 倍もの



保水力が持つが、その大きさとアルギン酸の構成糖であるウロン酸の含有量とは相関しないことを報告している。

アラメ粉末による盲腸重量の増加は、難溶性成分 (F3) およびメタノール抽出物による増加は見られないことから、F1 および F2 成分の盲腸内での発酵が重量増加に大きく関与するものと推察される。F2 で粗抽出されたアルギン酸の分子量は数千から数百万まで幅広く含まれていると考えられるが、F2 食で示された糞便重量の増加は前章の実験で示された HAG の影響と一致し、一方、盲腸重量の増加は AG5 の影響と一致している。

盲腸内のアンモニア濃度はアラメ粉末により有意に低下し、Fig. 32 に示したように F2 でも低下の傾向が示されており、F2 成分が関与していることが推察される。この結果は Fig. 31 に示した糞便重量と負の相関があるようにも思われる。しかし、第 2 章の実験において海藻粉末そのものをラットに摂取させた場合には、糞便重量とアンモニア濃度は相関しているように思えるが明確ではなく (Fig. 9, 13)、また第 3 章の実験において 5 種類の海藻多糖類をラットに摂取させた結果にはその相関は認められない (Fig. 21, 22)。アンモニアは腸内の腐敗物の指標とされ、腸内において低濃度である方が望ましいとされるが、その吸収や生成は盲腸内の pH や短鎖脂肪酸濃度などによって大きく左右され、また pH や短鎖脂肪酸の濃度もアンモニア濃度に影響される<sup>91-94)</sup>と考えられる。従って、アンモニア濃度に対する影響の結果は大小だけではなく、摂取された食餌の腸内発酵性、あるいは腸内発酵に及ぼす影響と合わせて検討する必要があると思われる。

血漿 TG は F2 以外で有意な減少が示されたが、特に難溶性画分およびメタノール抽出物により低い値が示され、褐藻類中の水溶性多糖類以外の成分にも血中脂質を強く抑制する物質が含まれていることが確認された。難溶性画分を摂取した群では肝臓重量が有意に減少していた。肝臓重量は摂取する脂質の量によっても増減することが知られており<sup>111)</sup>、前章考察で述べたように、血液中を循環する脂質の量と相関があるものと考えられる。F2 に AG5 のような TC 抑制作用は認められなかった。F2 による盲腸内 pH の低下が認められなかったこと、および TG、TC の減少が認められなかったことから、第 3 章でも述べたが、アルギン酸ナトリウムあるいはその他の水溶性多糖類でも血中 TG および TC の抑制には、胆汁酸排泄能の他に腸内での発酵性が深く関与していると考えられる。

アラメ粉末や各粗抽出多糖類また難溶性画分により腸内の最優勢菌である bacteroidaceae を増加させ、それにともない総生菌数も増加した。しかし、bifidobacteria 菌数は F1, F2 および F3 食では有意に増加しているものの、メタノール抽出物によりその菌数は減少の傾向であり、アラメ粉末食ではコントロール食の菌数とほぼ変わらなかった。また、lactobacilli についても同様の影響が見られた。この結果からメタノール抽出物中に bifidobacteria や lactobacilli などの乳酸菌の増加を抑制する成分が含まれていることが示された。さらに *in vitro* の実験でも、乳酸菌の発育およびグルコース資化による pH の低下がメタノール抽出物によって抑制された。この *in vitro* での抑制はラットで見られた影響と比べて小さいようにも思えるが、この結果によりメタノール抽出物に乳酸菌を抑制する因子が確実に含まれていることが示された。この抑制因子がどのような化合物であるかは本実験からは推定できないが、海藻中には抗ウィルス性、抗菌性、など腸内菌の発育に影響を及ぼすと考えられる多種多様な低分子量の生理活性物質が含まれている<sup>96-98)</sup>ことが知られている。1997 年度日本水産学会秋季大会では、青木ら<sup>112,113)</sup>が種々の海藻、とくにアラメのメタノール抽出物に強力な抗ウィルス活性があることを報告しており、また、栗原ら<sup>114)</sup>は乾燥海藻製品中のう蝕菌 (乳酸球菌 *Streptococcus* 属のうち *S. mutans* など数種の菌) に対する抑制因子 (脂肪酸と推定) について報告している。もし、このような生理活性物質や乳酸菌抑制因子が盲腸や大腸まで到達するなら、腸内フローラに影響を及ぼすと考えられる。

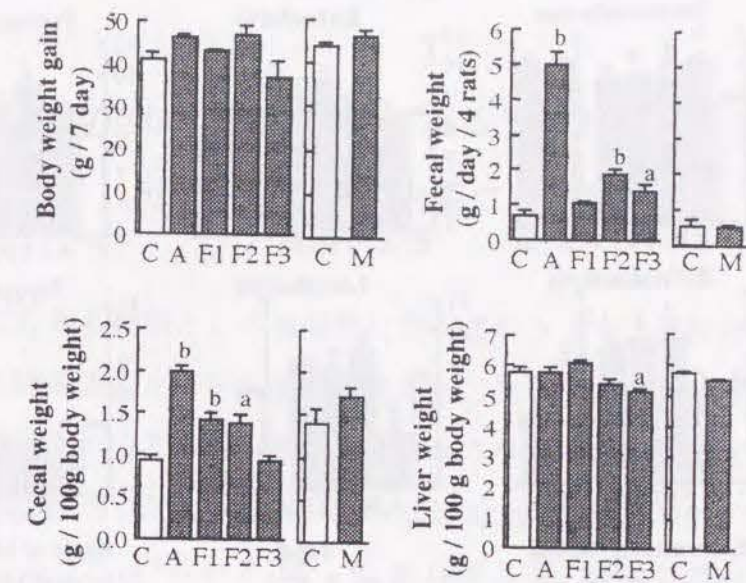
動物実験においてメタノール抽出物の摂取により、bifidobacteria および lactobacilli の菌数がそれぞれコントロールの約 1/50 および 1/10 と抑制される傾向を示しているが、F1 とアラメ粉末食を比べた場合、bifidobacteria 菌数は約 80 : 1, lactobacilli 菌数は約 400 : 1 である。この実験は同一の実験ではないので断言することはできないが、その他の F2 および F3 による bifidobacteria 菌数の増加も考慮して、メタノール抽出物よりもアラメ粉末そのものの摂取による乳酸菌抑制の方が強いと推察される。食物繊維の摂取により腸通過時間が短縮されること<sup>88)</sup>はよく知られており、また緒言から既に述べてきているように、とくにアルギン酸は脂質の他にアフラトキシンや Trp-P-1 あるいは重金属などの有害物質の腸管からの吸収を抑制する<sup>105)</sup>ことが報告されている。これらのことからアラメに含まれる乳酸菌の抑制因子はメタノールで粗抽出したものを摂取するよりも、アラメ粉末の状態



で摂取するほうが食物繊維の影響によりその乳酸菌抑制因子も小腸を通過し、盲腸内あるいは大腸まで到達しやすくなると考えられる。

以上の結果から、褐藻類の乾燥製品にはアルギン酸が多量に、またアラメ、ヒダカコンブなどの製品ではより発酵性の強いラミナランが含有されており、これらの多糖類の摂取は腸内フローラおよび腸内環境を介して、健康に対して有用な作用を示すが、ある種の海藻そのものを（通常の摂取量ではなく）高用量摂取した場合には、海藻多糖類だけではなくその他の成分も盲腸あるいは大腸まで到達し、腸内フローラおよび腸内環境に対して深く関与するものと考えられる。特に本実験で用いたアラメの場合、見かけの影響は、粗抽出した海藻多糖類の摂取の影響とは大きく異なることが示された。

アラメに限らず海藻中の低分子の生理活性物質について多くの研究が行われ、これからは様々な化合物が海藻から分離、同定されると思われるが、その生理活性は本研究の主題である食物繊維の生理活性と深く関わるものである。海藻を摂取した際の健康への影響に関する研究結果は、食物繊維および低分子化合物の両方の影響が明らかにされることにより、さらに明確で有用な知見になると考えられる。

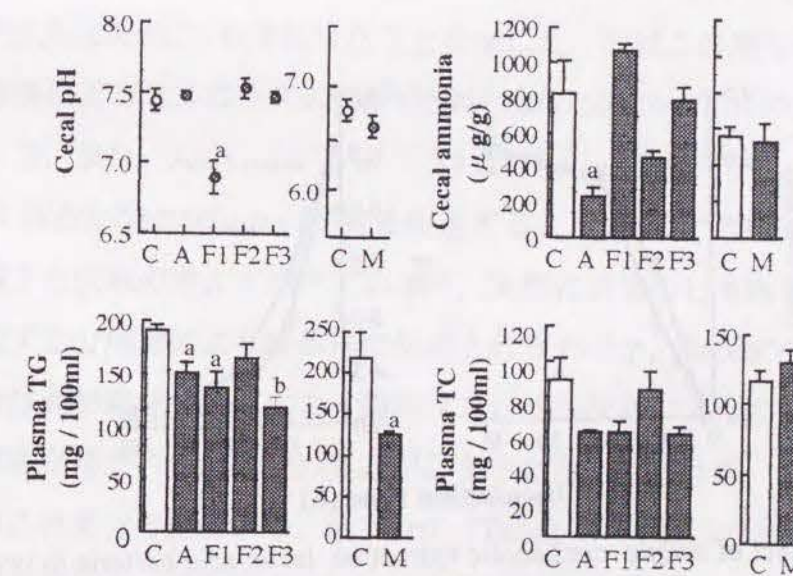


**Fig. 31** Effects of polysaccharides and methanolic extract of *aramé* on body, fecal, cecal and liver weight in rats

The rats were grouped (4 rats per group) and fed the following diets: Control diet (C), diet containing 5% *aramé* (A), 0.75% of 0.1N HCl extract (F1), 2.2% of 1% NaCO<sub>3</sub> extract (F2), 1.5% of insoluble contents (F3) and methanolic extract equivalents to 5% *aramé* (M).

Vertical bars represent the standard error of the mean.

\* Significant difference from the control <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p < 0.01$ .



**Fig. 32** Effects of polysaccharides and methanolic extract of *aramé* on cecal pH, ammonia and levels of plasma lipid in rats

See footnotes of Figs 22, 23 and 32.



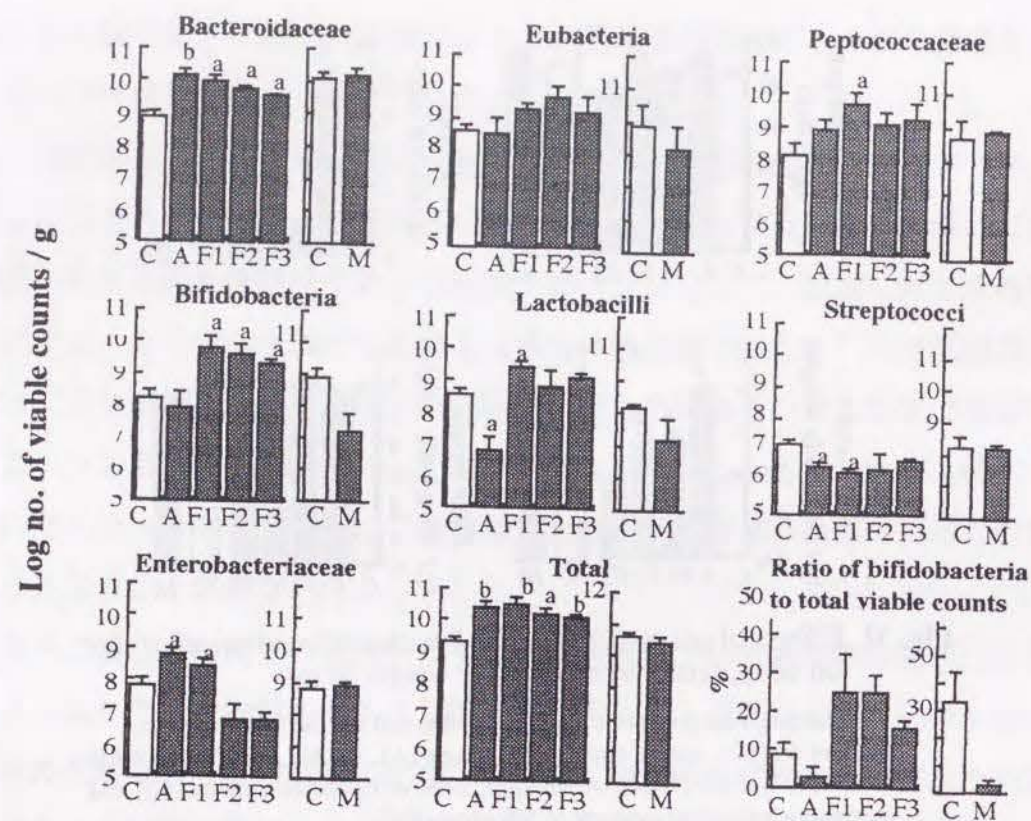


Fig. 33 Effect of polysaccharides and methanolic extract of *aramé* on cecal microflora in rats  
See footnotes of Fig. 31. Values are mean of log no. of viable counts  $\pm$  SE.

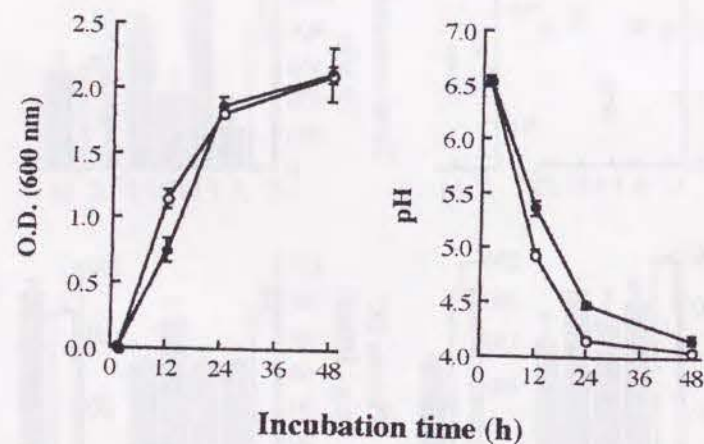


Fig. 34 Effect of *aramé* methanolic extract on lactic acid bacteria *in vitro*

*Bifidobacterium bifidum*, *B. breve* and *Lactobacillus acidophillus* were incubated in GAM1/2 (0.5% glucose) with (—●—) or without (---○---) methanolic extract solution of *aramé* (1% v/v).

## Clostridium ramosum によるラミナランからの 分解生成物の腸内菌による利用

ラミナランは貯蔵多糖類として褐藻類に含有される $\beta$ -1, 3 結合グルカンで、その硫酸化物は血液凝固阻止作用や抗腫瘍性などの生理活性が報告されている<sup>115)</sup>。ラミナランは食物繊維の中では腸内菌により分解されやすい物質とされる<sup>54)</sup>が、第1章の実験で分解能を示したヒト腸内の菌株は *Bacteroides ovatus* と *Clostridium* 属の数種のみであった (Table 2, 3)。しかし第3章の実験でラットに 0.4% または 2.0% ラミナラン食を7日間投与した場合、盲腸内の pH が顕著に低下、盲腸内容物の増加などラット盲腸内フローラによる発酵が示されただけでなく、ラミナラン分解能を持たないと考えられる bifidobacteria の菌数およびフローラ全体の総菌数に対する占有率 (ビフィズス菌占有率) が増加する傾向を示した。

森下<sup>116)</sup> はセルロース分解能は *Bacteroides succinogenes* や *Ruminococcus albus* などの特定の菌種に認められるが、ラットに 15% セルロース含有飼料を7週間与えた場合、bacteroidaceae や嫌気性球菌だけではなくセルロース分解能を持たない *Bifidobacterium* も増加したことを示した。彼はこの増加の原因としてセルロース分解菌によるセルロースの発酵状態が *Bifidobacterium* の発育を助けていると推察している。また、Akiyama et al.<sup>117)</sup> は *in vitro* においてアルギン酸のオリゴ糖類が数種の *Bifidobacterium* の発育を促進することを示し、アルギン酸摂取の影響について森下と同様の考えを述べているが、実際に通常のヒトあるいは実験動物の腸内に存在する分解菌により菌体外に生成されるものか、検討すべき点がある。これらの報告は食物繊維の摂取による腸内フローラの改善のメカニズムを推察しており非常に興味を持たれるが、その実証が必要であると思われる。

本研究のこれまでの結果から、*in vitro* (Table 4) においてセルロースは短期間ではヒト腸内菌によって発酵されないことや、アルギン酸もラミナランと比較すると発酵されにくく、またラット盲腸内の pH の低下作用などからも、セルロースやアルギン酸よりもラミナランのほうが腸内フローラおよび腸内環境に影響を及ぼしやすいと考えられる。上述したようにラミナランは食物繊維の中で発酵されやすい



ことは知られていたが、腸内フローラに対する影響を調べた例も本研究が最初であり、当然その分解物が *Bifidobacterium* をはじめその他の腸内菌種に及ぼす影響について検討した例もなかった。

そこで本章では、ヒト腸内のラミナラン分解菌による分解生成物が、ラミナラン分解能を持たない他の腸内菌、特に *Bifidobacterium* の発育に与える影響を *in vitro* で調べた。

### 実験材料および方法

#### 供試菌株

第1章で用いた菌株 (Table 3) の中から、腸内の代表的なラミナラン分解菌として *Clostridium ramosum* ATCC25582 および *Bacteroides ovatus* HAN5 を用いた。ラミナラン分解能を持たない代表的な菌株としては Table 18 に示した 11 菌種を用いた。供試菌株は全て GAM1 で 37℃、24 h 前培養後、実験に用いた。

#### *C. ramosum* および *B. ovatus* によるラミナランの資化性

ラミナラン (東京化成) を 2.0% 含む GAM1/2 を試験管に 10 ml ずつ調製し、前培養した *C. ramosum* または *B. ovatus* の菌液を 0.4 ml ずつ接種した。スチールウール法を用い 37℃ で培養し、0, 6, 12 および 24 h で培養を止め、第1章と同様の方法で培養液の pH および濁度 (600 nm) を測定し、発酵能の強い菌株をラミナラン分解菌として以下の実験に用いた。

#### ラミナラン分解物の調製

ラミナランを 2.0% 含む GAM1/2 を 200 ml ずつ三角フラスコ 4 個に調製し、GAM1 で前培養したラミナラン分解菌の培養液を 2 ml ずつ接種した。フラスコ内を無酸素 CO<sub>2</sub> ガス置換後、ブチルゴム栓をして 37℃ で培養した。培養開始 0, 6, 12 および 24 h 後の培養液を遠心分離 (10,000 rpm × 15 min) し、上清について pH を 1 N 水酸化ナトリウムで 7.0 に調製した。その後、沸騰水中で 5 min 加熱し酵素を失活させ、冷却後孔径 0.22 μm のフィルターでろ過滅菌し、ラミナラン分解物を含む溶液とした。対照としてラミナランを含まない GAM1/2 を用いて同様の調製を行った。

#### ラミナラン分解物の活性炭吸着クロマトグラフィー

培養液中の単糖、二糖および三糖類を活性炭吸着クロマトグラフィー<sup>83)</sup> を用いて確認した。すなわちクロマトグラフ用活性炭素 (和光純薬) を充填した 7 mm × 130 mm のカラムに試料 0.5 ml を注入し、移動相として 0, 5, 10 および 15% (v/v) エタノールを順次 30 ml 流し、溶出液を 2 ml ずつ分取し、フェノール硫酸法<sup>83)</sup> により糖を検出した。糖類の標準としてグルコース (和光純薬)、セロビオース (ICN Biochemical) およびラフィノース (和光純薬) を各糖 2 g/l 含む水溶液を用いた。

#### 代表的な腸内菌によるラミナラン分解生成物の利用

上記のように調製したラミナラン分解生成物を含む溶液 5 ml を同量の GAM1 に加えたものを試験培地とした。これに前培養したヒトの代表的な腸内菌株の菌液 0.2 ml を接種し、無酸素 CO<sub>2</sub> ガス置換後 37℃ で培養し、0, 12, 24 および 48 h 培養した。培養後、濁度 (600 nm) および pH を調べ、ラミナラン分解生成物の利用能を検討した。

### 結 果

#### ラミナラン分解菌による資化性

*C. ramosum* および *B. ovatus* の発育および培養液の pH に対するラミナランの影響を Fig. 35 に示した。両菌株の培養液ともラミナランの存在により濁度が増加し pH が低下したが、*C. ramosum* でより顕著で pH は 4.5 (対照は 5.7) まで低下し、濁度は対照の 2~3 倍の値を示した。この結果より以下の実験にはラミナラン分解菌として *C. ramosum* を用いた。

#### ラミナランからの単糖およびオリゴ糖の生成

*C. ramosum* 培溶液中の単糖、二糖および三糖について活性炭クロマトグラフィーを用いて調べた結果を Fig. 36 に示した。2%ラミナラン含有培地において培養 12 h 後に培養液 (菌体外) に三糖の生成が、24 h 後に二糖および単糖類が生成され、三糖類は減少していることが示された。ラミナランを含有しない培地ではこれらの糖類は検出されなかった。



### 代表的な腸内菌によるラミナラン分解生成物の利用

ヒトの代表的な腸内菌株の *C. ramosum* によるラミナラン分解生成物の利用能を培養後の濁度から判定した結果を Table 18 に示した。 *C. ramosum* を培養して 12 h 後の生成物を 11 株中 7 株が、24 h 後の生成物を 11 株中 8 株が利用能を示し、24 h 後の生成物がより強く腸内菌の発育を促進させた。特に *Bifidobacterium bifidum*, *B. adolescentis*, *Enterococcus faecium*, *Peptostreptococcus productus* など、乳酸を生成する菌種に強く発酵され、発育を促進させることが示された (Fig. 37)。 *Bifidobacterium* でも *B. longum* には利用能は認められなかった。また、 *Bacteroides vulgatus* および *E. coli* にも利用能は認められなかった。

### 考 察

第 3 章および第 4 章の実験で、ラットに市販のラミナランまたはアラメから抽出した粗ラミナランを投与した場合、ラミナラン分解菌を含むと推察される (第 1 章の *in vitro* の実験結果から) bacteroidaceae 以外に、 *in vitro* ではラミナラン発酵能を示さなかった bifidobacteria が盲腸内で増加傾向あるいは有意な増加を示した (Fig. 29, 33)。また、同様の影響が低分子量アルギン酸ナトリウム (AG5) でも示された (Fig. 30, 33)。森下<sup>116)</sup> はラットに 15% セルロース含有食を 7 週間投与した場合に bifidobacteria が増加したことについて、セルロース分解菌の菌体表面または菌体外に生成されたオリゴ糖を、他の菌群よりもオリゴ糖による増殖促進を受けやすい bifidobacteria が優先的に利用しているのではないかと説明した。著者もラミナランや AG5 による bifidobacteria の増加の理由について第 3 章考察で同様の考えを述べた。

本実験で *C. ramosum* はラミナランを強く発酵し、第 1 章でヒト糞便を培養した場合 (Table 5) の結果と一致しており、 *B. ovatus* による発酵は *C. ramosum* ほど顕著ではなく、ラット盲腸内容物を培養した結果 (Table 7) と一致していた。腸内でどちらが優勢なラミナラン分解菌となるかで腸内環境や宿主に対する影響も異なってくると考えられるが、本実験ではより強く、ヒト糞便と同様の発酵性を示した *C. ramosum* によるラミナラン分解物について検討した。その結果、培養 12 h

後に三糖類の存在が認められ、24 h 後にはより低分子量の二糖類、単糖類の生成が認められ、三糖類は極端に減少していた。データは示していないが、さらに培養を長時間延長した場合にはこれらの単糖およびオリゴ糖類は検出されなくなるため、 *C. ramosum* によって速やかに短鎖脂肪酸などに代謝されるものと考えられる。

この培養 12 h および 24 h 後に菌体外に生成された分解物が、 *in vitro* においてラミナランを発酵できないいくつかの菌種が利用した、とくに *Bifidobacterium bifidum* および *B. adolescentis* による明確な利用能を示した本結果は、上述の著者、また森下の仮説を裏付けるものである。

腸内にはアルギン酸分解菌が存在し、アルギン酸のオリゴ糖が *Bifidobacterium* の発育を促進することが報告されている<sup>117)</sup> にもかかわらず、第 3 章の実験では高粘度のアルギン酸ナトリウム (HAG) 投与では bifidobacteria の増加などは認められず、低分子量で粘性の低いアルギン酸ナトリウム (AG5) のみが bifidobacteria 菌数およびビフィズス菌占有率の増加傾向、顕著な盲腸内 pH の低下を示した。この相違の原因として、HAG はその粘性のため盲腸内での発酵条件を変えたことと、AG5 の方が低分子であるため分解速度が HAG よりも速いことが考えられる。

本章の実験で用いた市販のラミナランは、アラメ由来で主に  $\beta$ -グルカンのみで構成されており<sup>78)</sup> (海藻種によっては一部の還元末端にマンニトールが結合している場合もある)、 *C. ramosum* 培養液中に生成されたオリゴ糖は、グルコースのみから構成されるラミナリビオースとラミナリトリオースであると考えられる。HAG についても投与期間を森下らの実験のように長期にすれば、AG5 と同様の結果が得られると思われるが、ラミナランの構成糖であるグルコースからなるオリゴ糖と、アルギン酸の構成糖であるマンヌロン酸やグルロン酸<sup>78,82)</sup> からなるオリゴ糖 (Fig. 38) では、前者のほうが腸内菌に資化されやすいと考えられ、腸内での発酵や腸内環境に対する作用の発現も速く、また顕著であると考えられる。

以上の結果からラミナランの摂取による腸内フローラ、また腸内フローラを介した宿主へ及ぼす影響については以下のように推察される (Fig. 39)。「摂取されたラミナランは大腸あるいは盲腸まで到達し、 *Bacteroides* spp. や *Clostridium* spp. などの一部の細菌によって分解され、菌体外あるいは菌体表面にその単糖やオリゴ糖などが生成される。この単糖やオリゴ糖などはラミナラン分解菌自身もちろん利用するが、オリゴ糖類によって発育支持を受けやすい *Bifidobacterium* も活性化され腸内フローラのバランスが改善される。さらに、その発酵による短鎖脂肪酸の



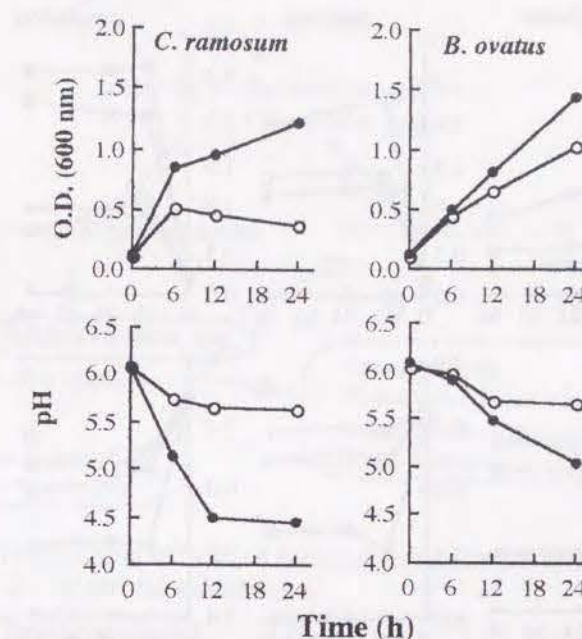
生成は pH の低下や腸内腐敗物生成の抑制など, *Bifidobacterium* にとって好適な発育環境を与え, 感染防御の役割も果たす. 腸内フローラが改善されることにより, 宿主の健康へも有用な影響を与える.」. この宿主に与える影響は AG5 や他の発酵性食物繊維でも同様にあり, AG5 のように胆汁酸排泄作用持つ場合は短鎖脂肪酸との相乗効果で血中の脂質濃度が抑制されると考えられる (Fig. 40).

緒言でも述べたように, 腸内フローラの構成と機能はヒトの健康にとって重要であることは現在ではよく知られるようになってきた<sup>27-29)</sup>. 本章の実験では発酵性食物繊維としてラミナランを, その分解菌として *C. ramosum* をそれぞれ 1 種類ずつしか用いていないため, 全ての食物繊維と腸内フローラの関連を説明することはできない. しかしこの結果は「発酵性食物繊維の摂取による腸内フローラ改善のメカニズム」を *in vitro* で初めて実証するものであり, 食物繊維によるヒト健康への影響を考える上で重要な知見である.

**Table 18** Utilization by intestinal bacteria of degraded products from laminaran by the action of *Clostridium ramosum*

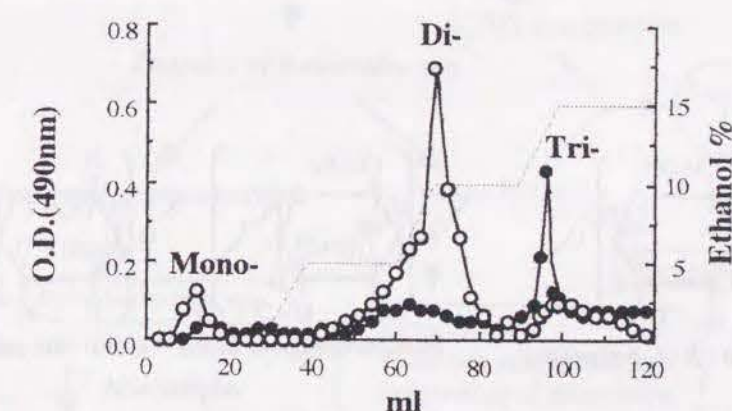
Microorganisms	Incubation time of <i>C. ramosum</i> in GAM1/2 with 2% laminaran			
	0 h	6 h	12 h	24 h
<i>Bacteroides vulgatus</i>	—	—	—	—
<i>B. distasonis</i>	—	—	+	+
<i>Clostridium innocuum</i>	—	—	+	++
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	—	—	—	+
<i>Peptostreptococcus productus</i>	—	W	++	++
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	—	—	+	++
<i>B. adolescentis</i>	—	W	+	++
<i>B. longum</i>	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i>	—	—	—	—
<i>Enterococcus faecium</i>	—	—	W	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	—	—	W	+

Judged from bacterial growth in the medium, comparing to that without saccharides.  
W; more than the same optical density at 600 nm (O.D.), +; more than 1.5 times O.D. level, ++; more than 2.0 times O.D. level, —; no reaction.



**Fig. 35** Effects of laminaran on the growth of *Clostridium ramosum* and *Bacteroides ovatus*.

○—; Incubated in GAM 1/2 without saccharides.  
●—; Incubated in GAM1/2 with 2% laminaran.



**Fig. 36** Activated charcoal chromatography of mono-, di- and tri-saccharides from 2% laminaran by *Clostridium ramosum*

0.5 ml of 12 hr culture (●) and 24hr culture (○) were charged on the activated charcoal column (7 × 130 mm) and eluted with 0 ~ 15 % ethanol (0.5 ml / min).

Saccharides in fractions were detected by the phenol-sulfuric method.



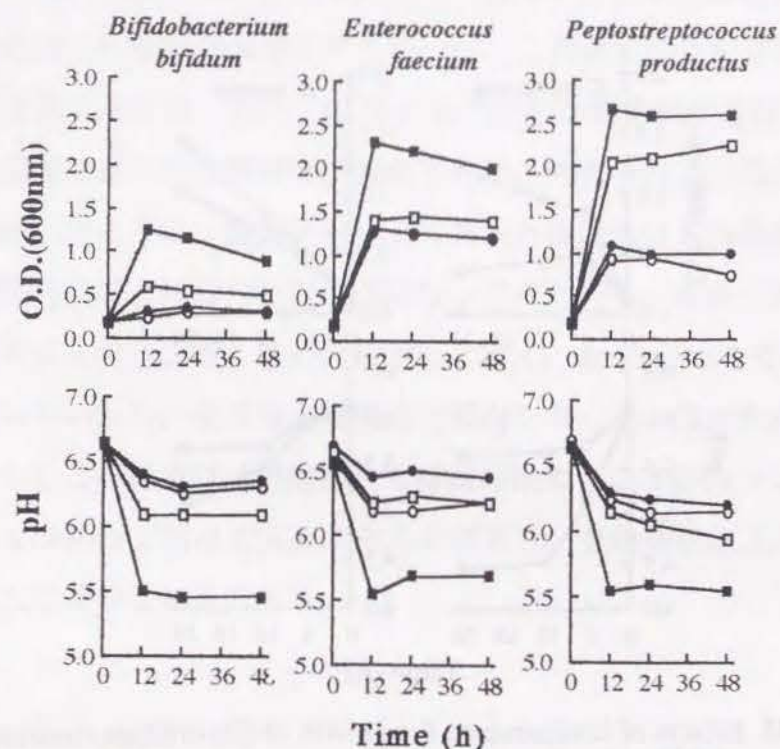


Fig. 37 Effects of degraded products from laminaran by the action of *Clostridium ramosum* on the growth of intestinal bacteria which can not utilize laminaran

Test media had been added with cell-free cultures of *C. ramosum* in GAM1/2 broth with laminaran for 0 h; —○—, 6 h; —●—, 12 h; —□— and 24 h; —■—.

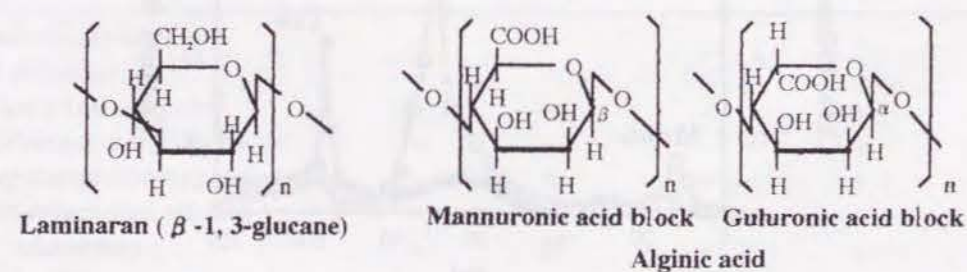


Fig. 38 Structures of laminaran and alginic acid<sup>(78,82)</sup>

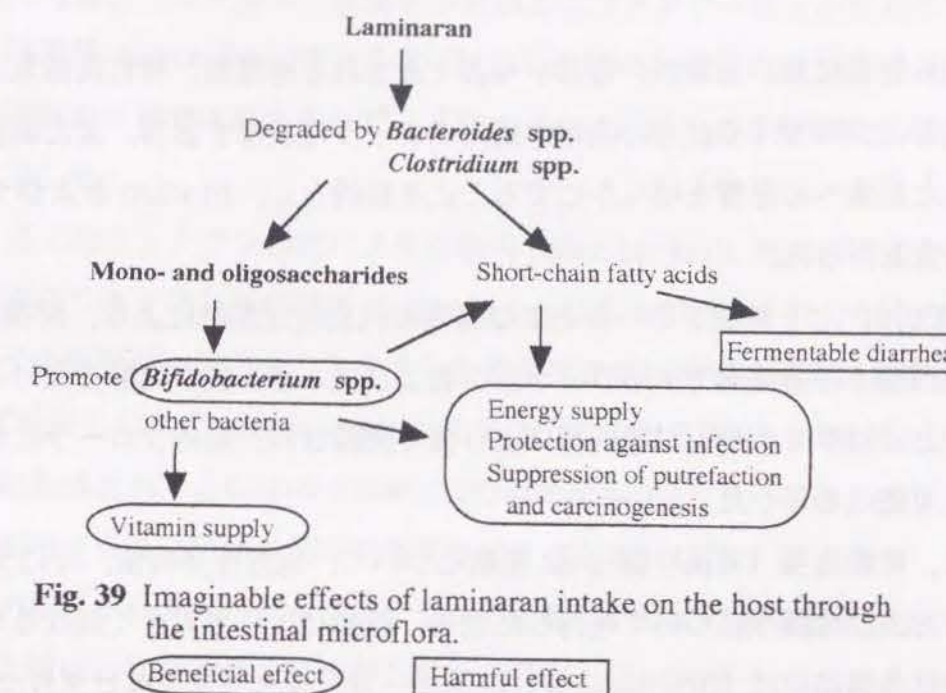


Fig. 39 Imaginable effects of laminaran intake on the host through the intestinal microflora.

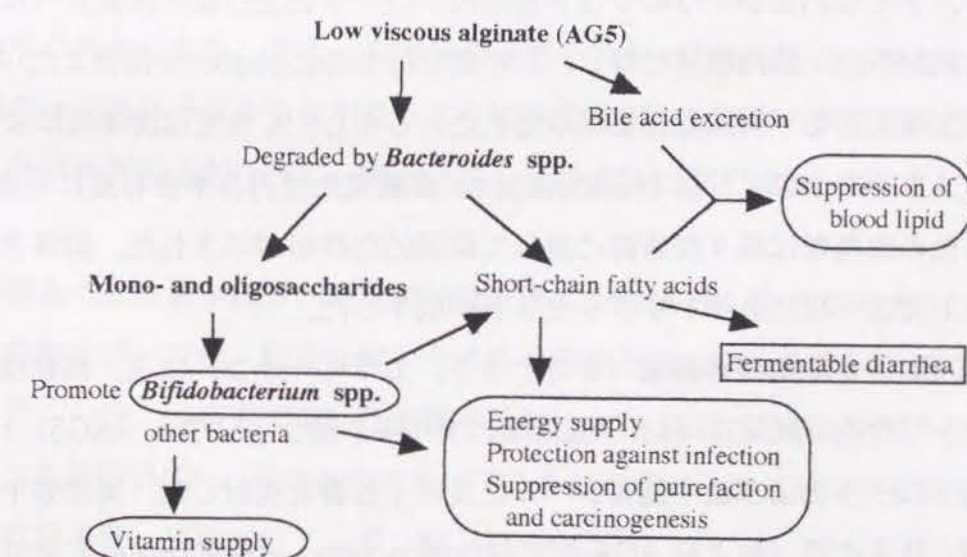


Fig. 40 Imaginable effects of low viscous sodium alginate (AG5) intake on the host through the intestinal microflora.

Beneficial effect      Harmful effect

\* In hyperlipidemia.



## 総 括

古くから健康に良いとされ、日常からよく食される海藻類、特に褐藻類と、各種海藻多糖類について、それらの摂取が腸内フローラに及ぼす影響、また腸内フローラを介した健康への影響を明らかにすることを目的とし、*in vitro* およびラットを用いた研究を行った。

第1章では、ヒト糞便フローラおよび腸内の代表的な菌株により、海藻多糖類の中でも褐藻類中の多糖類であるラミナランおよびアルギン酸が発酵を受けることを示した。とくにラミナランは腸内菌により強く発酵され、腸内フローラに対し影響を与える可能性を示した。

さらに、乾燥海藻（褐藻）製品 22 種類について、水溶性多糖類、特にラミナランの含有および発酵性について検討した結果、種類によって大きく異なるが、粗アルギン酸は各製品中に 10 % (w/w) 以上、一方、ラミナランはヒダカコンブ、ヒダカ根コンブおよびアラメの 3 種類から検出され、これらの粗抽出物はヒト腸内フローラによって発酵された。

第2章では9種類の海藻、コンブ、ワカメ、メカブ、アラメ、モズク、ヒジキ、アオノリ、アオサおよびノリのラット盲腸内フローラおよび血中脂質レベルに及ぼす影響を検討した。腸内環境に対し、1 % 食では *bifidobacteria* 菌数またはその占有率が増加傾向にあり有用な影響が示された。しかし5 % 食では海藻種によって様々で、メカブおよびノリは *bifidobacteria* 菌数または占有率を有意に増加させたが、その他の海藻類は様々な菌群に対して抑制的な作用が示された。海藻を摂取させたラットでは一様に血清トリグリセリドが低下した。

第3章では、2 % 海藻多糖類（ラミナラン、カラギーナン、寒天、高粘度のアルギン酸ナトリウム（HAG）および低粘度のアルギン酸ナトリウム（AG5））のラット盲腸内フローラおよび血中脂質レベルに及ぼす影響を検討した。褐藻類中の発酵性多糖類、ラミナランおよび AG5 食で *bifidobacteria* 菌数または占有率が増加傾向を示し、盲腸内の pH が低下するなど、腸内環境に有用な影響を示した。

またこれらの作用はそれぞれ 0.4 % 食という低濃度の投与でも認められたが、高濃度（8 % または 10 %）の摂取では下痢様の症状をきたし、摂取量により異なった影響を与えることを示した。盲腸内 pH の低下はラミナランにおいてより顕著であ

り、また、血清総コレステロール（TC）の抑制は AG5 食のみで示された。

第4章では、アラメ粉末、粗抽出多糖類およびメタノール抽出物をラットに摂取させ、高用量（5 % w/w）アラメ食を摂取した際の乳酸菌の減少などの影響は、粗抽出多糖類の摂取では認められず、メタノールに可溶性の多糖類以外の成分によることを示した。

第5章ではラミナラン摂取による盲腸内 *bifidobacteria* 増加の要因を調べるため、腸内のラミナラン分解菌株 *C. ramosum* によってラミナランから分解生成される低分子の糖類が、腸内のラミナランを利用できない菌株の発育に対する影響を *in vitro* で検討した。*C. ramosum* によりラミナランから単糖、二糖および三糖が培養液中に生成され、これらの生成物は *Bifidobacterium* やその他いくつかのラミナランを利用できない菌種の発育を促進させることを示した。

以上の結果から考えられるラミナランの影響については第5章の Fig. 39 に示した。また同様に低分子量のアルギン酸ナトリウム（AG5）の推察される影響について Fig. 40 に示した。海藻多糖類のうちラミナランや AG5 などの発酵性多糖類は、腸内の分解菌により分解された後、ビフィズス菌に利用され、腸内フローラに対し有用な作用を示すと考えられる。海藻そのものを摂取した場合には、その摂取量により異なった影響が現われることが示されたが、通常の摂取量（1 % w/w）では有用であると考えられる。また、高用量の海藻そのものの摂取と各多糖類の摂取の影響が異なっており矛盾する点があるようにみえるが、海藻中の多糖類以外の成分の中に乳酸菌抑制因子が存在し、腸内フローラの変動に深く関わっていることが示された。

各海藻食による血中脂質への抑制的な影響にも多糖類以外の成分が深く関与すると考えられるが、近年、脂質分解・合成系の酵素を阻害する物質が数多く報告されている<sup>78)</sup>。一方、本研究で用いた海藻多糖類については、脂質排泄能<sup>89)</sup>と腸内発酵性の両方を持つ AG5 のみが有意に血中 TC を低下させ、より強い脂質排泄能を持つ通常の高分子量、高粘度のアルギン酸ナトリウムや、より強い腸内発酵性を持つラミナランでは、血中 TC の低下は示されなかった。この結果は水溶性（発酵性）食物繊維の機能性として非常に注目されている血中 TC 抑制の作用機作に胆汁酸排泄能と腸内フローラによる働きが深く関わっていることを証明している。

海藻中の食物繊維の摂取による血中脂質など健康への影響についてもこれまでも多くの研究者によって論じられてきた<sup>100-102)</sup> が、腸内フローラとの関連で研究した



例はこれまでほとんどなかった。また、海藻中の低分子の生理活性物質について多くの研究が行われており、これからも様々な化合物が海藻から分離、同定されると思われるが、その生理活性は本研究の主題である食物繊維の生理活性と深く関わるものである。ホルモンや生薬成分、変異原物質などは腸内フローラによって代謝され活性化または不活化される<sup>118)</sup>ことが知られている。海藻中の低分子の生理活性因子も腸内フローラによる代謝を受けることが考えられるため、今後この点について研究が行われれば重要な新知見が得られると思われ、その場合、本研究の結果が重要な意味を持つと考えられる。

かつて大腸は腸内容物から水分を吸収し、不要物を糞便として排泄するためだけの器官と考えられがちであったが、既に述べてきたように実際には腸内フローラを介して様々な代謝活動が行われており、ビタミンをはじめヒトにとって重要な栄養物を作り出す有用な発酵槽である一方、ニトロソアミン、スカトールなどの発癌物質、腐敗物質などを作り出す有害な発酵槽でもある<sup>119)</sup> (Fig. 39, 40)。それゆえに、腸内フローラをコントロールすることは健康にとって重要なことであり、その方法として食餌成分でコントロールすることが、有効性、安全性、経済性などからみて最も優れた方法と考えられる。

本研究において腸内フローラへの影響に関して示された一連の結果はヒトの健康を考える上で重要な知見であると考えられる。将来、食餌と腸内フローラの関係、藻類に含まれる栄養、および生理活性物質などを研究する上で、本論文が役立てば幸いである。

## Summary

### Study on Effects of Edible Algae and Algal Polysaccharides on Intestinal Microorganisms

Takashi Kuda

Some brown algae, red algae and green algae have been consumed as marine foods in Japan from olden times. It is well known that algal polysaccharides (dietary fibers) have good effects on human health, such as the improvement of constipation, the suppression of blood lipid level and the excretion of toxic compounds. On the other hand, the effects of algal polysaccharides on the intestinal microflora is not well known, though dietary fibers have been considered to affect health through the activity of intestinal microflora.

This study was carried out to determine the effects of marine algae and algal polysaccharides on the intestinal microflora and intestinal environment. The outlines of the study are as follows.

#### 1. Fermentation of Algal Polysaccharides by Intestinal Bacteria *in vitro*

##### 1-1. Fermentation of Algal Polysaccharides by Human Intestinal Bacteria

Dilutions of human feces were tested for their ability to ferment polysaccharides (alginate, laminaran, fucoidan, carrageenan, agar and cellulose). Alginate and laminaran, especially laminaran, were fermented by fecal microflora, although fucoidan, carrageenan and cellulose were not fermented. *Bacteroides ovatus* showed the ability to ferment alginate. *B. ovatus* and some *Clostridium* spp. fermented laminaran.

##### 1-2. Fermentable Dietary Fiber in Dried Products of Brown Algae

The content of fermentable dietary fibers, laminaran and alginate, in 22 dried products of brown algae were studied. After washing with methanol, 0.1 N hydrochloric acid fractions (F1: crude laminaran and fucoidan), 1% sodium carbonate fractions (F2: crude alginate) and insoluble fractions (F3) were extracted from the algae using ethanol precipitation method. F1, F2 and F3 ranged from about one to 22%, 10 to 67% and three to 59%, respectively, of dry matter. Laminaran was detected in three products by bioassay using *Clostridium ramosum*. Laminaran content was the highest in *arame* *Eisenia bicyclis*. Fucoidan was not detected in *arame* by TLC. Fermentation pattern of F1 and F2 of *arame* by human fecal flora were similar to that of laminaran and alginate, respectively.

#### 2. Dietary Effects of Edible Algae on Cecal Microflora and Levels of Blood Lipid in Rats

To examine the dietary effects of nine edible algae (*hijiki* *Hizikia fusiforme*, *kombu* *Laminaria* sp., *wakame* *Undaria pinatifida*, *mekabu* (sporophyll of *U. pinatifida*), *arame*, *mozuku* (okinawa-mozuku *Cladosiphon okamuranus*), *aosa* (*Hitoeegusa* *Monostroma nitidum*), *aonori* *Enteromorpha* sp. and *nori* (*amanori* *Porphyra*



sp. on the intestinal microflora and the levels of blood lipid, the diets containing one and five % of these algae were administered to male rats for one week. All of the diets containing algae increased the weight of feces. Most of these algae suppressed the level of serum triglycerides (TG) and free fatty acids (NEFA). The number of bifidobacteria increased with the diets containing 1% algae, while several diets containing 5% algae suppressed some bacterial groups.

### 3. Effects of Algal Polysaccharides (Dietary Fibers) on Cecal Microflora and Levels of Blood Lipid in Rats

#### 3- 1. Effects of Algal Polysaccharides on Cecal Microflora and Levels of Blood Lipid in Rats

To determine the effects of algal polysaccharides (laminaran, carrageenan, agar, high viscous alginate (HAG) and low viscous alginate (AG5)) at 2% level on the intestinal microflora and levels of blood lipid, these diets were administered to male rats for a week. Laminaran and carrageenan increased the cecal weight. Laminaran decreased the cecal pH value, while carrageenan and agar raised cecal pH value. No significant effects were shown in the case of HAG diet, while cecal pH value, serum TG, and serum cholesterol(TC) clearly dropped in the AG5 diet. Laminaran and AG5 had tendency to increase the ratio of bifidobacteria to total cecal microflora. On the other hand, carrageenan had tendency to decrease the ratio of bifidobacteria. Carrageenan increased the number of cecal enterobacteriaceae. Agar decreased the number of enterobacteriaceae.

#### 3 - 2. Effects of Dietary Concentration of Laminaran and Depolymerised Sodium Alginate on Rat Cecal Microflora and Levels of Blood Lipid

The diets containing 0.4, 2 and 8 % of laminaran or 0.4, 2 and 10 % of AG5 were administered to male rats for one week. The diets containing 8 and 10 % of these polysaccharides decreased body weight gain. The diet containing 10 % AG5 increased fecal weight. Cecal weights increased depending on the dose of the polysaccharides. Liver weights decreased depending on dose of AG5. Cecal pH values were the lowest at 2 % polysaccharides. Eight % laminaran decreased cecal ammonia. Plasma TG decreased depending on dose of the polysaccharides. AG5 decreased plasma TC. High density lipoprotein cholesterol (HDL) of plasma increased by the diets containing 8 % laminaran and 0.4 % AG5. Ratio of cecal bifidobacteria to total bacteria was the highest at both of 0.4 % polysaccharides.

#### 4. Effects of Crude Polysaccharides and Methanolic Extracts of *Arame* on Cecal Microflora and Levels of Blood Lipid in Rats

Diets containing 5% *arame* powder (AP) (whose content is too high for normal intake), 0.75% F1, 2.2% F2 and 1.5% F3 of *arame*, that are respectively dose equivalents to 5% of AP, were administered to male rats for one week. AP and F2 increased fecal weight. AP, F1 and F2 increased cecal weight. F1 lowered cecal pH. AP decreased cecal ammonia. Plasma TG was suppressed by AP, F1 and F3. F1, F2 and F3 increased cecal bifidobacteria, and F1 increased lactobacilli. AP did not change the number of bifidobacteria and decreased lactobacilli. Methanolic extract of *arame* (dose equivalents to 5% of AP) had tendency to decrease cecal bifidobacteria and lactobacilli in rats. The methanolic extract suppressed the growth and fermentation of lactic

acid bacteria (mixed culture of *Bifidobacterium bifidum*, *B. breve* and *Lactobacillus acidophilus*) *in vitro*.

#### 5. Effect of Degraded Products of Laminaran by *Clostridium ramosum* on the Growth of Intestinal Bacteria

Degraded products of laminaran by the action of *Clostridium ramosum* were studied for their constituent mono-, di- and tri-saccharides by active carbon column chromatography. Tri-saccharide was detected in 2% laminaran - containing GAM broth culture which was incubated with *C. ramosum* for 12 h. Mono- and di-saccharides were detected in 24 h culture. Among 11 strains of authentic intestinal bacteria which can not ferment laminaran, 7 and 8 strains utilized the former and the latter products, respectively. Particularly, the growth of lactic acid- or acetic acid-forming bacteria such as some species of *Bifidobacterium* and *Enterococcus* was promoted by these degraded products.

These results indicate that fermentable polysaccharides in algae are utilized by some groups of intestinal bacteria including *Bifidobacterium* after being degraded by polysaccharide-utilizing bacteria such as *Bacteroides ovatus* and *Clostridium ramosum*. Increase in the number of bifidobacteria in intestine is thought to be profitable. Furthermore, it was indicated from the results of experiments *in vivo* with HAG and AG5 that fermentation of dietary fiber affects the levels of blood lipid.



稿を終えるにあたり、本研究において終始、懇意にご指導下さった東京水産大学食品生産学科、藤井建夫教授、また、学部・大学院博士前期過程においてご指導下さった奥積昌世先生、佐伯和昭先生に深甚なる謝意を表する。大変貴重な時間を費やし本稿の審査をされた東京水産大学食品生産学科 鈴木 健先生、浦野直人先生、長島裕二先生、木村 凡先生に深く感謝の意を表する。本研究を遂行するという貴重な機会と惜しみないご協力下さった、石川県農業短期大学食品科学科の横山理雄教授をはじめ諸先生方に深く感謝の意を表する。本研究に供した菌株の一部を分与された東京大学獣医畜産学科、平山和宏先生、ならびに多くのご指導とともに貴重な試薬を快くご提供下さった共成製薬株式会社、西澤 信博士に感謝の意を表する。さらに小林武志先生、豊岡（旧姓 長谷川）綾女史をはじめ東京水産大学食品微生物学研究室諸氏、その他多くの方々に多岐にわたりご協力いただいた。ここに謹んで感謝の意を表する。

## 文 献

- 1) 西澤一俊：海藻学入門，講談社，東京（1989），pp. 12-23.
- 2) 大林太良編：日本の古代 8；海人の伝統，中公文庫，東京（1996），pp. 1-469.
- 3) 宮下 章：海藻，法政大学出版局，東京（1974），pp. 1-315.
- 4) S. Mabeau and J. Flieurance: Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trend. Food Sci. Technol.*, 4, 103-107 (1993).
- 5) A. Jensen: Present and future needs for algae and algal products. *Hydrobiol.*, 260/261, 15-23 (1993).
- 6) M. Lahaye: Marine algae as sources of fibers: determination of soluble and insoluble dietary fiber contents in some 'sea vegetables'. *J. Sci. Food. Agric.*, 54, 587-594 (1991).
- 7) T. Nishimune, T. Sumimoto, T. Yakusiji, N. Kunita, T. Ichikawa, M. Doguchi and S. Nakahara: Determination of total dietary fiber in Japanese foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74, 350-359 (1991).
- 8) 森 公平，久島和美，岩崎富生，大宮弘道：海草に含まれる Dietary fiber について，日農化誌，55，97-104（1981）。
- 9) H. Trowell: Food and dietary fiber. *Nutri. Rev.*, 35, 6-11 (1977).
- 10) 印南 敏：食物繊維の定義と用語「食物繊維」（印南 敏，桐山修八編），第一出版，東京（1982），pp. 7-11.
- 11) 四訂日本食品標準成分表のフォローアップに関する調査報告 IV，日本食物繊維成分表の説明「四訂食品成分表 1996」（香川 綾監修），女子栄養大学出版部，東京（1996），pp. 36-42.
- 12) D. P. Burkitt and A. R. Walker: Saint's triad: confirmation and explanation. *S. Afr. Med. J.*, 18, 2136-2138 (1976).
- 13) D. P. Burkitt: Varicose veins: facts and fantasy. *Arch. Surg.*, 111, 1327-1332 (1976).
- 14) D. P. Burkitt: Relationships between diseases and their etiological significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 30, 262-267 (1977).
- 15) D. P. Burkitt: Colonic-rectal cancer: fiber and other dietary factors. *Am. J. Clin. Nutr.*, 31, S58-S64 (1978).
- 16) H. Trowell: Definition of dietary fiber and hypotheses that it is a protective factor in certain diseases. *Am. J. Clin. Nutr.*, 29, 417-427 (1976).
- 17) H. Trowell: The development of the concept of dietary fiber in human nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 31, S3-S11 (1978).
- 18) J. H. Cummings, M. J. Hill, D. J. Jenkins, J. R. Pearson and H. S. Wiggins: Changes in fecal composition and colonic function due to cereal fiber. *Am. J. Clin. Nutr.*, 29, 1468-1473 (1976).
- 19) J. H. Cummings, W. Branch, D. J. Jenkins, D. A. Southgate, H. Houston and W. P.



- James: Colonic response to dietary fibre from carrot, cabbage, apple, bran. *Lancet*, 7, 5-9 (1978).
- 20) J. H. Cummings, D. A. Southgate, W. J. Branch, H. S. Wiggins, H. Houston, D. J. Jenkins, T. Jivraj and M. J. Hill: The digestion of pectin in the human gut and its effect on calcium absorption and large bowel function. *Br. J. Nutr.*, 41, 477-485 (1979).
  - 21) A. M. Stephen and J. H. Cummings: Mechanism of action of dietary fibre in the human colon. *Nature*, 20, 283-284 (1980).
  - 22) A. M. Stephen: Should we eat more fibre ?. *J. Hum. Nutr.*, 35, 403-414 (1981).
  - 23) A. M. Stephen, H. S. Wiggins, H. N. Englyst, T. J. Cole, B. J. Wayman and J. H. Cummings: The effect of age, sex and level of intake of dietary fibre from wheat on large-bowel function in thirty healthy subjects. *Br. J. Nutr.*, 56, 349-361 (1986).
  - 24) T. Mitsuoka, K. Ohno, Y. Benno, K. Suzuki and K. Namba: The fecal flora of man. IV. Communication: Comparison of the newly developed method with the old conventional method for the analysis of intestinal flora. *Zentralbl. Bakteri.*, 234, 219-233 (1976).
  - 25) 光岡知足: 腸内細菌の話, 岩波新書, 東京 (1978), pp. 1-58.
  - 26) T. Mizutani and T. Mitsuoka: Effect of intestinal bacteria on incidence of liver tumors in gnotobiotic C3H/He male mice. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 63, 1365-1370 (1979).
  - 27) K. Suzuki and T. Mitsuoka: N-nitrosamine formation by intestinal bacteria. *IARC Sci. Publ.*, 57, 275-281 (1984).
  - 28) K. Itoh, W. K. Lee, H. Kawamura, T. Mitsuoka and T. Magaribuchi: Intestinal bacteria antagonistic to *Clostridium difficile* in mice. *Lab. Anim.*, 21, 20-25 (1987).
  - 29) K. Itoh, T. Urano and T. Mitsuoka: Colonization resistance against *Pseudomonas aeruginosa* in gnotobiotic mice. *Lab. Anim.*, 20, 197-201 (1986).
  - 30) Y. Benno and T. Mitsuoka: Impact of *Bifidobacterium longum* on human fecal microflora. *Microbiol. Immunol.*, 36, 683-694 (1992).
  - 31) T. Mitsuoka, H. Hidaka, T. Eida: Effect of fructo-oligosaccharides on intestinal microflora. *Nahrung*, 31, 427-436 (1987).
  - 32) 田中隆一郎: 腸内細菌の利用「腸内細菌学」(光岡知足編), 朝倉書店, 東京 (1990), pp. 426-439.
  - 33) M. Sugawara, K. Suzuki, K. Endo, Y. Tashiro, K. Nakamura, K. Suzuki, T. Fujisawa, N. Shiragami and T. Mitsuoka: Effect of dietary fat and fiber on fecal flora, bacterial metabolites, and fecal properties in Japanese volunteers. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 38, 317-328 (1992).
  - 34) T. Mitsuoka: The effect of nutrition on intestinal flora. *Nahrung*, 28, 619-625 (1984).
  - 35) Y. Benno, K. Endo, T. Mizutani, Y. Namba, T. Komori and T. Mitsuoka: Comparison of fecal microflora of elderly persons in rural and urban areas of Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1100-1105 (1989).
  - 36) Y. Benno, K. Endo, H. Miyoshi, T. Okuda, H. Koishi and T. Mitsuoka: Effect of rice fiber on human fecal microflora. *Microbiol. Immunol.*, 33, 435-440 (1989).
  - 37) A. A. Salyers, J. R. Vercellotti, S. E. West and T. D. Wilkins: Fermentation of muchins and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34, 319-322 (1977).
  - 38) A. A. Salyers, S. E. H. West, J. R. Vercellotti and T. D. Wilkins: Fermentation of muchins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34, 529-533 (1977).
  - 39) A. A. Salyers, J. K. Palmar and T. D. Wilkins: Degradation of polysaccharides by intestinal bacterial enzymes. *Am. J. Clin. Nutr.*, 31, S128-S130 (1978).
  - 40) C. E. Bayliss and A. P. Houston: Characterization of plant polysaccharide- and muchin-fermentating anaerobic bacteria from human feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 626-632 (1984).
  - 41) C. Michel and G. T. Macfarlane: Digestive fates of soluble polysaccharides from marine macroalgae: involvement of the colonic microflora and physiological consequences for the host. *J. Appl. Bacteriol.*, 80, 349-369 (1996).
  - 42) A. S. Truswell: Dietary fibre and blood lipids. *Curr. Opin. Lipidol.*, 6, 14-19 (1995).
  - 43) M. Bagger, O. Andersen, J. B. Nielsen and K. R. Rytting: Dietary fibres reduce blood pressure, serum total cholesterol and platelet aggregation in rats. *Br. J. Nutr.*, 75, 483-493 (1996).
  - 44) C. D. Jensen, W. Haskell and J. H. Whittam: Long-term effects of water-soluble dietary fiber in the management of hypercholesterolemia in healthy men and women. *Am. J. Cardiol.*, 79, 34-37 (1997).
  - 45) R. M. Kay: Effects of dietary fiber on serum lipid levels and fecal bile acid excretion. *Can. Med. Assoc. J.*, 123, 1213-1217 (1980).
  - 46) J. L. Vigne, D. Lairon, P. Borel, H. Portugal, A. M. Pauli, J. C. Hauton and H. L. Afont: Effect of pectin, wheat bran and cellulose on serum lipids and lipoproteins in rats fed on a low- or high-fat diet. *Br. J. Nutr.*, 58, 405-413 (1987).
  - 47) J. W. Anderson, A. E. Jones and S. Riddle-Mason: Ten different dietary fibers have significantly different effects on serum and liver lipids of cholesterol-fed rats. *J. Nutr.*, 124, 78-83 (1994).
  - 48) 菅野道廣: 脂質「新栄養化学」(内藤 博ら共著), 朝倉書店, 東京 (1987), pp. 107-142.
  - 49) 辻 啓介: コレステロール代謝「食物繊維」(印南 敏, 桐山修八編), 第一出版, 東京 (1982), pp. 131-159.
  - 50) M. Noakes, P. M. Clifton, P. J. Nestel, R. Le Leu and G. McIntosh: Effect of high-



- amylose starch and oat bran on metabolic variables and bowel function in subjects with hypertriglyceridemia. *Am. J. Clin. Nutr.*, 64, 944-951 (1996).
- 51) C. Moundras, S. R. Behr, C. Demigne, A. Mazur and C. Remesy: Fermentable polysaccharides that enhance fecal bile acid excretion lower plasma cholesterol and apolipoprotein E-rich HDL in rats. *J. Nutr.*, 124, 2179-2188 (1994).
  - 52) 竹久文之: 食物繊維摂取ラットにおける血漿コレステロールと糞排泄ステロイドもしくは盲腸内短鎖脂肪酸との相関. 栄食誌, 45, 325-331 (1992).
  - 53) Y. Kishimoto, S. Wakabayashi and H. Takeda: Hypocholesterolemic effect of dietary fiber: relation to intestinal fermentation and bile acid excretion. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 41, 151-161 (1995).
  - 54) 印南 敏, 池上幸江: 食物繊維の腸管内における消化と代謝「食物繊維」(印南 敏, 桐山修八編), 第一出版, 東京 (1982), pp. 224-241.
  - 55) 光岡知足: 腸内菌と食物繊維, 「食物繊維」(印南 敏, 桐山修八編), 第一出版, 東京 (1982), pp. 242-270.
  - 56) T. Yajima: Contractile effect of short-chain fatty acids on the isolated colon of the rat. *J. Physiol.*, 368, 667-678 (1985).
  - 57) T. Yajima and T. Sakata: Influence of short-chain fatty acids on the digestive organs. *Bifidobacteria Microflora*, 6, 7-14 (1987).
  - 58) 光岡知足: 試薬と培地「嫌気性菌の分離と同定法」(日本細菌学教育委員会編), 菜根出版, 東京 (1982), pp. 94-103.
  - 59) 五十嵐泰夫, 児玉 徹: 嫌気性菌の培養「新化学実験講座17, 微生物実験法」(日本生化学会編), 東京化学同人, 東京 (1992), pp. 121-128.
  - 60) 光岡知足: Steel wool 法「腸内菌の世界(改訂版)」, 叢文社, 東京 (1984), pp. 45-46.
  - 61) 上野一恵, 渡辺邦友, 小林とよ子: 試薬と培地「嫌気性菌の分離と同定法」(日本細菌学教育委員会編), 菜根出版, 東京 (1982), p. 39.
  - 62) 光岡知足: 腸内菌叢の分類と生態, 食生活研究会, 東京 (1986), pp. 19-49.
  - 63) 志多伯良博: 低分子化アルギン酸ナトリウムの生理作用と応用. 月間フードケミカル, 13 (1), 62-67 (1997).
  - 64) 新城明久: 2群(標本)の平均値の比較「生物統計学入門」, 朝倉書店, 東京 (1986), pp. 35-44.
  - 65) 辨野義巳, 光岡知足: ヒトの腸内フローラに及ぼす食餌成分の影響「腸内フローラと成人病」(光岡知足編), 学会出版センター, 東京 (1985), pp. 29-63.
  - 66) 光岡知足: 腸内菌叢の分類と生態, 食生活研究会, 東京 (1986), pp. 159-302.
  - 67) C. Michel, M. Lahaye, C. Bonnet, S. Mabeau and J. L. Barry: In vitro fermentation by human faecal bacteria of total and purified dietary fibers from brown seaweed. *Br. J. Nutr.*, 75, 263-280 (1996).
  - 68) L. Garnet, D. Daviaud, C. Denis-Pouxviel, C. Remesy and J. C. Murat: Effects of

- short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29. *Int. J. Cancer.*, 52, 286-289 (1992).
- 69) L. R. Jacobs: Effect of dietary fiber on colonic cell proliferation and its relationship to colon carcinogenesis. *Prev. Med.*, 16, 566-571 (1987).
  - 70) L. R. Jacobs: Relationship between dietary fiber and cancer: metabolic, physiologic, and cellular mechanisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 183, 299-310 (1986).
  - 71) 光岡知足: 腸内菌叢の形成, 推移, 分布「腸内細菌学」(光岡知足編), 朝倉書店, 東京 (1990), pp. 87-107.
  - 72) 森下芳行: ヒト腸内フローラの形成と推移「腸内フローラの構造と機能」, 朝倉書店, 東京 (1990), pp. 20-23.
  - 73) 伊藤喜久治: 動物の腸内菌叢「腸内細菌学」(光岡知足編), 朝倉書店, 東京 (1990), pp. 136-145.
  - 74) O. Wrong: Nitrogen metabolism in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.*, 31, 1587-1593 (1978).
  - 75) A. Vince, R. Zeegen, J. E. Drinkwater, F. O'Grady and A. M. Dawson: The effect of lactulose on the faecal flora of patients with hepatic encephalopathy. *J. Med. Microbiol.*, 7, 163-168 (1973).
  - 76) K. Ito and K. Hori: Seaweed: chemical composition and potential food uses. *Food Rev. Int.*, 5, 101-104 (1989).
  - 77) 西澤一俊: 養殖コンブの生育に伴う栄養素の変動(上). 食品と開発, 31 (8), 43-46 (1996).
  - 78) 西澤一俊: 同化および貯蔵性物質の検出と同定「藻類研究法」(西澤一俊, 千原光雄編), 共立出版, 東京 (1979), pp. 579-591.
  - 79) 瀬川宗吉: 原色日本海藻図鑑増補, 保育社, 東京 (1996), pp. 1-196.
  - 80) W. A. P. Black: Methods in Carbohydrate Chemistry. 5 (ed. R. L. Whistler), Academic Press, New York (1965), pp. 159-161.
  - 81) A. Haug: Methods in Carbohydrate Chemistry 5 (ed. R. L. Whistler), Academic Press, New York (1965), pp. 69-73.
  - 82) 西澤一俊: 細胞間粘質多糖「藻類研究法」(西澤一俊, 千原光雄編), 共立出版, 東京 (1979), pp. 616-630.
  - 83) 瀬野信子, 阿武喜美子, 木幡 陽: 液体クロマトグラフィー「糖質の化学」(日本生化学会編), 東京化学同人, 東京 (1976) pp. 283-316.
  - 84) 菅原 潔, 福島正美: 蛋白質の定量法 第3版, 学会出版センター, 東京 (1990), pp. 158-160.
  - 85) 江指隆俊: 動物の飼育と管理「小動物を用いる栄養実験」(細谷憲政, 印南 敏, 五島孜郎編), 第一出版, 東京 (1980), pp. 14-28.
  - 86) 光岡知足: 腸内菌叢の検索法「腸内菌の世界(改訂版)」, 叢文社, 東京 (1984), pp. 53-92.



- 87) T. Suzuki, Y. Ohsugi, Y. Yoshie, T. Shirai and T. Hirano: Dietary fiber content, water-holding capacity and binding capacity of seaweeds. *Fisheries Sci.*, 62, 454-461 (1996).
- 88) 奥 恒行: 消化管機能への影響, 便容量の増加, 消化管通過時間の短縮「食物繊維」(印南敏, 桐山修八編), 第一出版, 東京(1982), pp. 81-99.
- 89) 山となつみ, 小川宣子, 坂田 隆: メカブの粘性物質の物性と大腸内発酵基質としての性状(IV), 第51回日本栄養・食糧学会講演要旨集, 104 (1997).
- 90) 河津大輔, 藤井建夫, 大島直子, 奥積昌世: スサビノリのラット盲腸フローラに及ぼす影響. 日水誌, 60, 111-115 (1994).
- 91) 河津大輔, 田中みさ子, 藤井建夫: スサビノリ多糖類の腸内フローラに及ぼす影響. 日水誌, 61, 59-69 (1995).
- 92) A. Vince, A. M. Dawson, N. Park and F. O'Grady. Ammonia production by intestinal bacteria. *Gut*, 14, 171-177 (1973).
- 93) A. J. Vince and S. M. Bryant: Ammonia production by intestinal bacteria: the effect of lactose, lactulose and glucose. *J. Med. Microbiol.*, 13, 177-191 (1980).
- 94) O. D. Castell and E. W. More: Ammonia absorption from the human colon. *Gastroenterology*, 60, 33-42 (1971).
- 95) A. Willis, C. L. Bullen, A. T. Williams, C. G. Fagg, A. Bourne and M. Vignon. Breast milk substitute: a bacteriological study. *Brit. Med. J.*, 4, 67-72 (1973).
- 96) I. Mahasneh, M. Jamal, M. Kashashneh and M. Zibden: Antibiotic activity of marine algae against multi-antibiotic resistant bacteria. *Microbios.*, 83, 23-26 (1995).
- 97) G. A. Ingram: Lectins and lectin-like molecules in lower plants. I. Marine algae. *Dev. Comp. Immunol.*, 9, 1-10 (1985).
- 98) N. Jurkovic, N. Kolb and I. Colic: Nutritive value of marine algae *Laminaria japonica* and *Undaria pinatifida*. *Nahrung*, 39, 63-66 (1995).
- 99) 池上幸江, 土橋 昇, 永山スミ子, 原田広和, 西出英一, 印南 敏: ラットの消化吸収能に及ぼす難消化性多糖類の影響. 栄食誌, 35, 163-168 (1983).
- 100) 西澤一俊: 海藻の生理活性物質(1). 食品と開発, 24 (5), 54-59 (1989).
- 101) 西澤一俊: 生活習慣病予防食としての海藻. *Food Style* 21, 1 (2), 38-43.
- 102) 吉江由美子, 鈴木 健, 平野敏行: 海藻食品に含まれる食物繊維の加工による変化とその栄養学的役割. 東京水産大研報, 82, 191-205 (1996).
- 103) J. M. Cambell, G. C.F. ahey, Jr and B. W. Wolf: Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J. Nutr.*, 127, 130-136 (1997).
- 104) 矢島高二: 消化管機能へ与える影響「腸内細菌学」(光岡知足編), 朝倉書店, 東京(1990), pp. 313-319.
- 105) 渡辺一弘, 岩田一幸, 丹代優香, 西澤 信: 可溶性アルギン酸ナトリウムのコレステロール, Trp-P-1及びアフラトキシンB1のラットでの排泄に及ぼす影響. 衛生化学, 38, 258-262

- (1992).
- 106) A. Terada, H. Hara and T. Mitsuoka: Effect of dietary alginate on the faecal microbiota and faecal metabolic activity in humans. *Microbial Ecology Health Dis.*, 8, 259-266 (1996).
- 107) K. T. Fracis: HDL cholesterol and coronary heart disease. *South Med. J.*, 73, 169-173 (1980).
- 108) N. A. Iudaev, S. A. Afinogenova, N. P. Goncharov and G. V. Katsiia: Paths of corticosteroid biosynthesis in the adrenal glands of rhesus monkeys. *Probl. Endokrinol. (Mosk.)*, 23, 92-96 (1977).
- 109) N. A. Iudaev and S. A. Afinogenova: Pathways of corticosteroid biosynthesis in human adrenals (Itsenko-Cushing disease). *Biokhimiia*, 41, 1619-1627 (1976).
- 110) 日本人の摂取栄養量年次推移「四訂食品成分表1996」(香川 綾監修), 女子栄養大学出版部, 東京(1996), pp. 452-453.
- 111) P. Yaqoob, E. J. Sherrington, N. M. Jeffery, P. Sanderson, D. Harvey, E. A. Newsholme and P. C. Calder: Comparison of the effects of a range of dietary lipids upon serum and tissue lipid composition in the rat. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 27, 297-310 (1995).
- 112) 青木資子, 野呂忠秀, 亀井勇統: 北日本沿岸海藻の抗ウイルス活性の探索. 平成9年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 192 (1997).
- 113) 青木資子, 野呂忠秀, 亀井勇統: アラメ由来抗ウイルス物質の分離・精製. 平成9年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 192 (1997).
- 114) 栗原秀幸, 後藤百合枝, 会田雅彦, 高橋是太郎: 水産食品に含まれるう蝕抑制因子. 平成9年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 122 (1997).
- 115) 前田昌撤, 西澤一敏: 海藻多糖類「総合多糖類化学(下)」, 講談社, 東京(1974), pp. 289-348.
- 116) 森下芳行: 食事要因「腸内フローラの構造と機能」, 朝倉書店, 東京(1990), pp. 56-87.
- 117) H. Akiyama, T. Endo, R. Nakakita, K. Murata, Y. Yonemoto and K. Okayama: Effect of depolymerised alginates on the growth of bifidobacteria. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 355-356 (1992).
- 118) 光岡知足 編: 「腸内フローラの代謝」, 学会出版センター, 東京(1988), pp. 1-243.
- 119) 森下芳行: 腸内フローラの考え方と研究の将来「腸内フローラの構造と機能」, 朝倉書店, 東京(1990), pp. 195-204.



# 付 表

付表1 培地および試薬類

本文中の引用順で記載した。滅菌は断りのない限りオートクレーブ処理のこと。

希釈液A <sup>(56)</sup>		GAM1 試験培地	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.5 g	GAM糖分解用半流動培地 (ニッスイ) を冷水で	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.0 g	調製し、ろ紙 (No.2) を用いてろ過しカンテンを除	
L-cystein · HCl · H <sub>2</sub> O	0.5 g	去後、試験管に分注して滅菌 (115°C, 15min)。	
Tween 80	0.5 g	GAM1/2, GAM1/4 はそれぞれこの培地に対して等	
Agar	1.0 g	量、3倍量の希釈液Aを加えたもの。	
脱イオン水	1000 ml		
115°C, 20min 滅菌			
BTB-MR 液 <sup>(56)</sup>		GAM agar	
Bromothymol blue	0.2 g	変法GAM寒天培地 (ニッスイ)	
Methyl red	0.1 g	ES solution <sup>(56)</sup>	
Methanol	300 ml	Sodium propionate	30 g
脱イオン水	200 ml	コリマイシン	20 mg
		硫酸フラジオマイシン	400 mg
		ストレプトマイシン硫酸塩	1.0 g
BS solution <sup>(56)</sup>		脱イオン水で 100 ml にメスアップ	
Sodium propionate	30 g		
アミノサイジン (協和)	100 mg	Bacteroides agar	
フラジオマイシン硫酸塩	400 mg	バクテロイデス培地 (ニッスイ)	
LiCl	6.0 g		
脱イオン水で 100 ml にメスアップ			
Clostrisel solution		FM agar	
ロンガリット	4 g	変法FM 培地 (ニッスイ)	
ネオマイシン	0.3 mg	DHL agar	
NaN <sub>3</sub>	0.8 mg	DHL寒天培地 (ニッスイ)	
脱イオン水で 100 ml にメスアップ			
LBS agar <sup>(56)</sup>		PEA agar	
LBS agar (BBL)	84 g	フェニルエチルアルコール寒天培地 (ニッスイ)	
Lab-lemco powder (Oxoid)	8 g	ジフェニルアミン-アニリン-リン酸試薬 <sup>(57)</sup>	
Sodium · acetate · 3H <sub>2</sub> O	15 g	ジフェニルアミン	2 g
脱イオン水	1000 ml	アニリン	2 ml
加温溶解		アセトン	100 ml
Acetic · acid	3.7 ml	溶解	
		80% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	15 ml
EG agar		TS agar	
EG 寒天培地 (ニッスイ)		Trypticase soy agar (BBL)	40 g
BL agar		脱イオン水	1000 ml
BL 寒天培地 (ニッスイ)		115°C, 20 min 滅菌	
		馬脱繊維血	50 ml

BS agar		TATAC agar <sup>(56)</sup>	
BS 寒天培地 (ニッスイ)	1000 ml	Peptone	25 g
BS solution	50 ml	Yeast extract	10 g
		Sucrose	1 g
ES agar		Esculin	1 g
EG 寒天培地 (ニッスイ)	1000 ml	Agar	15 g
BS solution	50 ml	脱イオン水	1000 ml
		pH 7.6~7.8	
TATAC solution I		115°C, 20 min 滅菌	
NaN <sub>3</sub>	1000 ml	馬血清	50 ml
Sodium glutamate	50 ml	TATAC solution I	22 ml
脱イオン水で 100 ml にメスアップ		TATAC solution II	20 ml
100°C, 30 min 加温			
TATAC solution II		PEES agar	
Acridium orange	0.01 g	ブドウ球菌培地 (ニッスイ)	149 g
TTC	0.1 g	LiCl	5 g
0.65% Crystal violet	1 ml	Phenylethyl alcohol	2.5 ml
Thallous sulfate	1.65 g	脱イオン水	1000 ml
脱イオン水で 100 ml にメスアップ		115°C, 20 min 滅菌	
		50% 卵黄液	20 ml

付表2 動物実験に関するデータ

## 第2章に関するデータ

Table A-1 Effects of diets containing 1 % hijiki, aonori and nori on body, fecal, cecal and liver weight in rats

	Control	Hijiki	Aonori	Nori
Initial body weight (g)	106±6 <sup>*1</sup>	105±6	106±2	98±6
Body weight gain (g / 7 days)	50±7	51±4	53±10	53±2
Fecal weight (g / day / 4 rats)	1.24±0.44	2.24±0.44 <sup>a</sup>	2.92±0.68 <sup>a</sup>	2.08±0.32 <sup>a*2</sup>
Cecal weight (g / 100 g body weight)	1.24±0.33	1.03±0.22	1.30±0.14	1.22±0.23
Liver weight (g / 100 g body weight)	5.45±0.14	5.57±0.23	5.72±0.53	4.93±0.19 <sup>b</sup>

\*1 Values are mean ± S.D. of 4 rats.

\*2 Significant difference from the control : <sup>a</sup>p < 0.05; <sup>b</sup>p < 0.01.



**Table A-2** Effects of diet containing 5 % *hijiki*, *aonori* and *nori* on body, fecal, cecal and liver weight in rats

	Control	<i>Hijiki</i>	<i>Aonori</i>	<i>Nori</i>
Initial body weight (g)	91±3	92±3	93±3	91±5
Body weight gain (g / 7 days)	41±2	46±6	54±5 <sup>b</sup>	56±13
Fecal weight (g / day / 4 rats)	1.24±0.28	4.68±1.56 <sup>b</sup>	6.56±0.56 <sup>b</sup>	3.08±0.60 <sup>b</sup>
Cecal weight (g / 100 g body weight)	0.91±0.07	1.71±0.37 <sup>a</sup>	1.36±0.33	1.62±0.30 <sup>b</sup>
Liver weight (g / 100 g body weight)	6.15±0.90	5.42±0.58	5.07±0.59	4.36±0.59 <sup>a</sup>

See footnotes of Table A-1.

**Table A-3** Effects of diets containing 1 % *kombu*, *wakame* and *mekabu* on body, fecal, cecal and liver weight in rats

	Control	<i>Kombu</i>	<i>Wakame</i>	<i>Mekabu</i>
Initial body weight (g)	88±3	90±3	86±4	90±4
Body weight gain (g / 7 days)	34±9	34±33	50±4 <sup>a</sup>	31±32
Fecal weight (g / day / 4 rats)	1.40±0.22	2.18±0.38 <sup>a</sup>	1.95±0.26 <sup>a</sup>	1.76±0.18
Cecal weight (g / 100 g body weight)	1.30±0.25	1.46±0.35	1.35±0.23	1.40±0.25
Liver weight (g / 100 g body weight)	5.55±0.79	5.52±0.27	5.32±0.18	4.99±0.32

See footnotes of Table A-1.

**Table A-4** Effects of diets containing 5 % *kombu*, *wakame* and *mekabu* on body, fecal, cecal and liver weight in rats

	Control	<i>Kombu</i>	<i>Wakame</i>	<i>Mekabu</i>
Initial body weight (g)	100±6	97±4	96±5	95±4
Body weight gain (g / 7 days)	32±6	33±6	37±1	32±2
Fecal weight (g / day / 4 rats)	1.80±0.39	2.49±0.41	2.96±0.42 <sup>a</sup>	2.68±0.46 <sup>a</sup>
Cecal weight (g / 100 g body weight)	1.59±0.13	1.91±0.08 <sup>a</sup>	2.06±0.08 <sup>b</sup>	1.79±0.32
Liver weight (g / 100 g body weight)	4.75±0.23	4.78±0.26	4.33±0.29	4.27±0.29

See footnotes of Table A-1.

**Table A-5** Effects of diets containing 1 % *arame*, *mozuku* and *aosa* on body, fecal, cecal and liver weight in rats

	Control	<i>Arame</i>	<i>Mozuku</i>	<i>Aosa</i>
Initial body weight (g)	87±2	94±3	91±2	92±3
Body weight gain (g / 7 days)	52±4	59±11	50±6	52±3
Fecal weight (g / day / 4 rats)	1.40±0.22	2.18±0.38	1.95±0.26	1.76±0.18 <sup>a</sup>
Cecal weight (g / 100 g body weight)	1.30±0.25	1.46±0.35	1.35±0.23	1.40±0.25
Liver weight (g / 100 g body weight)	5.55±0.79	5.52±0.27	5.32±0.18	4.99±0.32 <sup>a</sup>

See footnotes of Table A-1.

**Table A-6** Effects of diets containing 5 % *arame*, *mozuku* and *aosa* on body, fecal, cecal and liver weight in rats

	Control	<i>Arame</i>	<i>Mozuku</i>	<i>Aosa</i>
Initial body weight (g)	86±6	87±3	87±3	86±0
Body weight gain (g / 7 days)	33±12	41±4	28±6	46±7
Fecal weight (g / day / 4 rats)	1.50±0.17	3.16±0.28 <sup>b</sup>	2.72±0.56 <sup>a</sup>	3.82±0.26 <sup>b</sup>
Cecal weight (g / 100 g body weight)	1.65±0.16	2.30±0.26 <sup>b</sup>	1.65±0.23	1.54±0.31
Liver weight (g / 100 g body weight)	4.51±0.12	4.85±0.27	5.31±0.63	4.49±0.02

See footnotes of Table A-1.

**Table A-7** Effects of diets containing 1 % *hijiki*, *aonori* and *nori* on the cecal pH, cecal ammonia and levels of serum lipid in rats

	Control	<i>Hijiki</i>	<i>Aonori</i>	<i>Nori</i>
Cecal pH	7.67±0.36 <sup>*1</sup>	7.66±0.29	8.01±0.09	7.84±0.04
Cecal ammonia (μg / g)	1141±67	967±198	657±95 <sup>b*2</sup>	699±145 <sup>b</sup>
Serum TG (mg / 100 ml)	130±26	99±17	56±25 <sup>a</sup>	69±17 <sup>a</sup>
Serum TC (mg / 100 ml)	102±9	98±3	121±21	94±4
Serum NEFA (μEq / l)	301±50	370±120	115±78 <sup>a</sup>	147±58 <sup>a</sup>

\*1 Values are mean±S.D. of 4 rats.

\*2 Significant difference from the control : <sup>a</sup>  $p < 0.05$ , <sup>b</sup>  $p < 0.01$ .  
TG; triglycerides. TC; total cholesterol. NEFA; free fatty acids.

**Table A-8** Effects of diets containing 5 % *hijiki*, *aonori* and *nori* on the cecal pH, cecal ammonia and levels of serum lipid in rats

	Control	<i>Hijiki</i>	<i>Aonori</i>	<i>Nori</i>
Cecal pH	7.62±0.26	7.76±0.11	8.58±0.15 <sup>b</sup>	7.48±0.29
Cecal ammonia (μg / g)	860±41	442±64 <sup>b</sup>	269±97 <sup>b</sup>	413±55 <sup>b</sup>
Serum TG (mg / 100 ml)	167±20	65±35 <sup>b</sup>	80±19 <sup>b</sup>	80±38 <sup>a</sup>
Serum TC (mg / 100 ml)	96±8	79±10	86±8	74±20
Serum NEFA (μEq / l)	530±33	314±60 <sup>b</sup>	233±72 <sup>b</sup>	378±215

See footnotes of Table A-7.

**Table A-9** Effects of diets containing 1 % *kombu*, *wakame* and *mekabu* on the cecal pH, cecal ammonia and levels of serum lipid in rats

	Control	<i>Kombu</i>	<i>Wakame</i>	<i>Mekabu</i>
Cecal pH	7.52±0.36	7.96±0.29	7.48±0.17	7.68±0.06
Cecal ammonia (μg / g)	595±136	478±153	560±57	448±128
Serum TG (mg / 100 ml)	125±26	124±7	110±13	76±11
Serum TC (mg / 100 ml)	100±12	79±17	96±9	100±11
Serum NEFA (μEq / l)	231±24	172±0 <sup>a</sup>	174±46	222±68

See footnotes of Table A-7.



**Table A-10** Effects of diets containing 5% kombu, wakame and mekabu on the cecal pH, cecal ammonia and levels of serum lipid in rats

	Control	Kombu	Wakame	Mekabu
Cecal pH	7.58±0.30	7.61±0.34	7.56±0.27	7.38±0.66
Cecal ammonia ( $\mu\text{g/g}$ )	588±78	394±139	110±62 <sup>b</sup>	186±213 <sup>a</sup>
Serum TG (mg / 100 ml)	165±41	138±36	80±48	86±50
Serum TC (mg / 100 ml)	77±27	64±8	80±16	51±18
Serum NEFA ( $\mu\text{Eq/l}$ )	512±150	252±43 <sup>a</sup>	292±119	285±120

See footnotes of Table A-7.

**Table A-11** Effects of diets 1% containing arame, mozuku and aosa on the cecal pH, cecal ammonia and levels of serum lipid in rats

	Control	Arame	Mozuku	Aosa
Cecal pH	7.60±0.29	7.38±0.16	7.94±0.13	7.56±0.52
Cecal ammonia ( $\mu\text{g/g}$ )	529±114	492±108	299±101 <sup>a</sup>	493±124
Serum TG (mg / 100 ml)	153±8	140±61	117±16 <sup>a</sup>	111±38
Serum TC (mg / 100 ml)	72±12	75±10	72±8	73±6
Serum NEFA ( $\mu\text{Eq/l}$ )	392±138	408±281	313±83	243±102

See footnotes of Table A-7.

**Table A-12** Effects of diets 5% containing arame, mozuku and aosa on the cecal pH, cecal ammonia and levels of serum lipid in rats

	Control	Arame	Mozuku	Aosa
Cecal pH	7.03±0.11	6.59±0.36	7.00±0.25	7.59±0.11 <sup>b</sup>
Cecal ammonia ( $\mu\text{g/g}$ )	741±205	280±119 <sup>a</sup>	676±425	312±84 <sup>a</sup>
Serum TG (mg / 100 ml)	191±31	133±17 <sup>a</sup>	140±32	55±29 <sup>b</sup>
Serum TC (mg / 100 ml)	85±21	74±10	85±8	101±11
Serum NEFA ( $\mu\text{Eq/l}$ )	576±142	289±35 <sup>a</sup>	273±78 <sup>a</sup>	365±75

See footnotes of Table A-7.

**Table A-13** Effect of diets containing 1% hijiki, aonori and nori on cecal microflora in rats

Organisms	Control	Hijiki	Aonori	Nori
Bacteroidaceae	11.0±0.1 <sup>*1</sup>	10.9±0.3	11.0±0.2	10.9±0.2
Eubacteria	9.3±1.5	9.5±0.5	9.6±0.5	10.0±0.7
Peptococcaceae	9.6±0.8	9.8±0.7	10.1±0.5	10.0±0.2
Bifidobacteria	8.8±1.0	9.9±0.2	9.6±1.1	10.4±1.1
Lactobacilli	7.9±1.9	8.9±2.3	9.1±1.5	9.6±2.5
Streptococci	7.9±0.6	8.8±1.2	7.6±0.5	7.2±0.8
Staphylococci	4.0±0.6(3) <sup>*2</sup>	3.6±0.4(3)	4.2(2)	3.5(2)
Enterobacteriaceae	9.4±0.4	9.6±0.5	8.6±0.7	8.5±1.0
Clostridia	9.1(2)	N.D. <sup>*3</sup>	N.D.	N.D.
Total viable counts	11.1±0.2	11.1±0.2	11.2±0.2	11.3±0.3
Ratio of bifidobacteria to total viable counts	1.5±1.8	6.7±3.1	8.1±8.4	25.8±25.3

\*1 Values are mean±S.D. of log bacterial counts per g cecal contents in 4 rats.

\*2 Number of subjects with organisms detected.

\*3 Not detected.

**Table A-14** Effect of diets containing 5% hijiki, aonori and nori on cecal microflora in rats

Organisms	Control	Hijiki	Aonori	Nori
Bacteroidaceae	9.4±0.4	9.5±0.4	9.2±0.1	10.0±0.2
Eubacteria	8.7±0.9	9.0±0.9	7.6±1.1	9.3±0.8
Peptococcaceae	8.8±0.9	8.1±1.4	7.9±1.1	8.8±1.4
Bifidobacteria	8.1±0.5	8.1±1.2	7.5±0.9	9.5±0.6 <sup>a*1</sup>
Lactobacilli	9.1±0.5	7.7±1.8	7.9±0.4 <sup>a</sup>	9.4±0.7
Streptococci	6.9±0.3	6.6±0.5	6.4±1.1	6.7±0.4
Staphylococci	4.6±0.9	4.1±1.0	4.0±0.5	4.0±0.4
Enterobacteriaceae	7.9±0.5	7.6±0.6	6.4±0.1 <sup>b</sup>	8.0±0.3
Clostridia	N.D.	N.D.	6.8(2)	8.6(1)
Total viable counts	9.7±0.3	9.9±0.4	9.4±0.1	10.5±0.2 <sup>b</sup>
Ratio of bifidobacteria to total viable counts	5.1±5.2	9.2±17.2	4.3±5.9	15.6±11.1

See footnotes of Table A-13.

\*1 Significant difference from the control: a  $p < 0.05$ ; b  $p < 0.01$ .



**Table A-15** Effect of diets containing 1% kombu, wakame and mekabu on cecal microflora in rats

Organisms	Control	Kombu	Wakame	Mekabu
Bacteroidaceae	10.9±0.2	10.8±0.2	10.6±0.3	10.7±0.3
Eubacteria	9.7±1.0	8.2±0.5	9.3±0.6	7.9±1.0
Peptococcaceae	6.7±2.4	7.7±0.7	6.6±0.5	7.1±1.0
Bifidobacteria	9.5±0.2	9.6±0.9	9.8±0.7	10.4±0.5 <sup>a</sup>
Lactobacilli	10.0±0.2	8.9±2.3	9.1±1.5	9.6±2.5
Streptococci	7.8±0.2	7.3±0.9	8.2±0.6	8.4±0.9
Staphylococci	3.7±0.5	3.8±0.2	3.8±0.2	3.8±0.3
Enterobacteriaceae	8.8±0.1	7.9±0.4 <sup>b</sup>	8.2±0.6	8.4±0.9
Total viable counts	11.1±0.2	10.9±0.2	11.1±0.1	11.0±0.4
Ratio of bifidobacteria to total viable counts (%)	2.8±0.7	12.2±14.4	9.9±6.9	24.7±4.9 <sup>b</sup>

See footnotes of Tables A-13 and A-14.

**Table A-16** Effect of diets containing 5% kombu, wakame and mekabu on cecal microflora in rats

Organisms	Control	Kombu	Wakame	Mekabu
Bacteroidaceae	11.1±0.2	10.7±0.1 <sup>a</sup>	10.1±0.3 <sup>b</sup>	10.2±0.3 <sup>b</sup>
Eubacteria	9.5±1.0	8.5±1.7	7.4±1.5	8.5±1.3
Peptococcaceae	9.0±1.6	8.7±0.6	7.2±0.7	8.2±1.6
Bifidobacteria	9.9±0.5	9.4±1.8	7.6±1.0 <sup>a</sup>	9.9±0.3
Lactobacilli	10.0±0.4	8.1±1.3	7.2±0.5 <sup>b</sup>	9.0±0.3 <sup>a</sup>
Streptococci	7.3±0.4	7.6±0.3	7.2±0.2	7.1±0.9
Staphylococci	4.3±0.4	4.5±0.1	3.5±0.3	4.9±0.7
Enterobacteriaceae	7.2±0.6	7.6±0.1	6.3±0.4	6.2±0.1 <sup>a</sup>
Total viable counts	11.2±0.2	10.9±0.3	10.3±0.1 <sup>b</sup>	10.5±0.2 <sup>b</sup>
Ratio of bifidobacteria to total viable counts (%)	8.0±5.8	18.5±12.8	1.2±2.0	23.6±6.0 <sup>a</sup>

See footnotes of Tables A-13 and A-14.

**Table A-17** Effect of diets containing 1% arame, mozuku and aosa on cecal microflora in rats

Organisms	Control	Arame	Mozuku	Aosa
Bacteroidaceae	10.9±0.2	11.0±0.1	10.7±0.2	10.7±0.3
Eubacteria	8.7±1.8	8.3±0.8	7.9±1.2	8.5±1.3
Peptococcaceae	8.4±1.8	8.1±1.2	7.2±1.2	9.5±0.9
Bifidobacteria	8.4±0.5	8.8±0.5	8.6±1.0	8.8±1.2
Lactobacilli	8.6±2.2	8.1±1.2	9.1±1.3	7.6±2.7
Streptococci	7.8±0.3	7.7±0.3	7.5±0.5	8.1±0.4
Staphylococci	5.9±0.4	5.0±0.6	4.5±0.6 <sup>a</sup>	5.4±0.7
Enterobacteriaceae	9.2±0.2	8.8±0.6	8.9±1.1	9.0±0.9
Total viable counts	11.1±0.2	11.1±0.1	10.8±0.1	10.9±0.2
Ratio of bifidobacteria to total viable counts (%)	0.4±0.5	0.6±0.4	3.0±5.4	2.0±2.1

See footnotes of Tables A-13 and A-14.

**Table 18** Effect of diets containing 5% arame, mozuku and aosa on cecal microflora in rats

Organisms	Control	Arame	Mozuku	Aosa
Bacteroidaceae	10.4±0.1	10.7±0.5	10.3±0.3	9.9±0.3 <sup>a</sup>
Eubacteria	8.4±1.0	8.8±0.7	8.5±1.0	7.8±1.1
Peptococcaceae	7.2±0.7	8.8±1.3	9.2±0.9 <sup>a</sup>	8.6±0.8
Bifidobacteria	9.5±1.5	8.8±1.2	9.2±0.8	9.0±0.4
Lactobacilli	9.8±0.9	8.4±1.4	8.3±0.7	8.3±0.6
Streptococci	7.3±0.7	7.2±0.3	7.8±0.9	6.8±0.8
Staphylococci	4.8±0.5	4.9±0.4	4.9±0.6	4.5±0.6
Enterobacteriaceae	7.8±0.7	7.2±0.5	8.7±0.7	6.0±0.4 <sup>b</sup>
Total viable counts	10.7±0.3	10.9±0.3	10.5±0.3	10.0±0.3 <sup>a</sup>
Ratio of bifidobacteria to total viable counts (%)	14.7±15.2	9.9±19.2	17.5±17.1	16.7±15.3

See footnotes of Tables A-14 and A-15.



### 第3章に関するデータ

**Table A-19** Effects of diet containing 2 % laminaran, carrageenan or agar on body, fecal, cecal and liver weight in rats

	Control	Laminaran	Carrageenan	Agar
Initial body weight (g)	64±2	64±3	64±1	64±2
Body weight gain (g / 7 days)	45±2	39±6	42±3	36±7
Fecal weight (g / day / 4 rats)	0.34±0.08	0.27±0.15	2.24±0.36 <sup>b</sup>	1.42±0.40 <sup>b</sup>
Cecal weight (g / 100g body weight)	1.38±0.21	2.52±0.71 <sup>a</sup>	1.85±0.19 <sup>a</sup>	1.36±0.24
wall weight	0.13±0.02	0.20±0.06 <sup>a</sup>	0.16±0.02	0.15±0.01
content weight	1.26±0.20	2.32±0.63 <sup>a</sup>	1.70±0.20 <sup>a</sup>	1.21±0.24
Liver weight(g / 100g body weight)	5.81±0.28	6.07±0.41	5.79±0.38	5.28±0.39

See footnotes of Table A-1.

**Table A-20** Effects of diet containing 2 % high or low viscous sodium alginate on body, fecal, cecal and liver weight in rats

	Control	HAG	AG5
Initial body weight (g)	61±2	60±3	60±5
Body weight gain (g / 7 days)	46±3	42±6	42±1
Fecal weight (g / day / 4 rats)	0.45±0.09	1.11±0.72	0.45±0.33
Cecal weight (g / 100g body weight)	1.19±0.26	2.13±0.83	3.14±0.71 <sup>b</sup>
wall weight	0.14±0.02	0.19±0.03 <sup>a</sup>	0.22±0.04 <sup>b</sup>
content weight	1.05±0.24	2.00±0.92	2.99±0.73 <sup>b</sup>
Liver weight(g / 100g body weight)	6.12±0.68	6.52±0.57	5.63±0.14

See footnotes of Table A-1.

HAG; high viscous sodium alginate, AG5; low viscous alginate.

**Table A-21** Effects of diets 2 % containing laminaran, carrageenan or agar on the cecal pH, ammonia and SCFAs in rats

	Control	Laminaran	Carrageenan	Agar
Cecal pH	6.93±0.16	6.02±0.23 <sup>b</sup>	7.53±0.30 <sup>a</sup>	7.50±0.23 <sup>a</sup>
Cecal ammonia (μg/g)	1185±507	968±206	1000±720	571±155
SCFAs (mg/g)				
Lactic acid	0.53±0.44	0.58±0.21	0.04±0.04	0.23±0.10
Acetic acid	2.11±0.77	1.77±0.80	0.76±0.37 <sup>a</sup>	0.92±0.20 <sup>a</sup>
Propionic acid	0.84±0.16	1.73±0.49 <sup>a</sup>	0.35±0.16 <sup>b</sup>	0.42±0.13 <sup>a</sup>
n-Butyric acid	0.48±0.18	1.11±0.28 <sup>a</sup>	0.21±0.07	0.27±0.15

SCFAs; Short-chain fatty acids.

\* Significant difference from the control : <sup>a</sup>  $p < 0.05$ , <sup>b</sup>  $p < 0.01$ .

**Table A-22** Effects of diets 2 % containing high or low viscous sodium alginate on the cecal pH, ammonia and SCFAs in rats

	Control	HAG	AG5
Cecal pH	7.51±0.25	7.21±0.62	6.41±0.23 <sup>b</sup>
Cecal ammonia (μg/g)	868±134	778±396	1530±552
SCFAs (mg/g)			
Lactic acid	0.41±0.18	0.37±0.28	0.22±0.10
Acetic acid	1.81±0.61	1.74±0.76	0.64±0.34 <sup>a</sup>
Propionic acid	0.86±0.11	0.65±0.16	0.32±0.11 <sup>b</sup>
n-Butyric acid	0.40±0.04	0.29±0.20	0.18±0.14 <sup>a</sup>

See footnotes of Table A-21.

**Table A-23** Effects of diets 2 % containing laminaran, carrageenan or agar on the levels of serum lipid in rats

	Control	Laminaran	Carrageenan	Agar
Serum TG (mg / 100 ml)	211±51	214±38	175±24	156±57
Serum TC (mg / 100 ml)	98±10	102±14	86±8	83±16
Serum HDL <sup>*1</sup> (% of TC)	55±10	63±13	51±6	56±11
Serum NEFA (μEq/l)	342±51	465±161	440±218	335±75

See footnotes of Table A-7.

\*1 High density lipoprotein cholesterol.

**Table A-24** Effects of diets 2 % containing high or low viscous sodium alginate on the levels of serum lipid in rats

	Control	HAG	AG5
Serum TG (mg / 100 ml)	217±49	159±59	114±37 <sup>a</sup>
Serum TC (mg / 100 ml)	113±10	103±18	83±1 <sup>a</sup>
Serum HDL (% of TC)	42±8	43±9	55±5
Serum NEFA (μEq/l)	330±94	235±6	284±92

See footnotes of Table A-7 and A-23.



**Table A-25** Effect of diets containing 2 % laminaran, carrageenan or agar on cecal microflora in rats

Organisms	Control	Laminaran	Carrageenan	Agar
Bacteroidaceae	10.6±0.4	10.6±0.4	10.6±0.3	10.6±0.1
Eubacteria	7.2±2.1	6.9±0.3	5.3±0.2	8.1±0.2
Peptococcaceae	10.1±0.8	8.9±1.0	8.5±1.3	8.8±0.4 <sup>a</sup>
Bifidobacteria	10.2±1.1	10.5±0.5	9.3±0.5	9.9±1.4
Lactobacilli	9.2±1.2	9.6±0.5	9.6±0.4	9.3±1.1
Streptococci	9.2±0.4	8.9±0.3	7.3±0.5	7.7±0.7
Staphylococci	4.0±0.0	N.D.	3.4±0.2 <sup>b</sup>	4.5±0.5
Enterobacteriaceae	9.0±0.8	9.1±0.4	10.7±0.3 <sup>a</sup>	6.8±0.3
Total viable counts	11.2±0.4	11.0±0.2	11.0±0.3	11.1±0.4
Ratio of bifidobacteria to total viable counts (%)	22.5±21.1	37.1±24.4	2.6±2.8	32.2±23.8

See footnotes of Tables A-13 and A-14.

**Table A-26** Effect of diets containing 2% high or low viscous sodium alginate on cecal microflora in rats

Organisms	Control	HAG	AG5
Bacteroidaceae	10.8±0.2	10.4±0.5	10.1±0.6
Peptococcaceae	10.4±0.2	9.7±1.0	10.1±0.8
Eubacteria	9.1±1.2	9.7±0.8	8.9±1.7
Bifidobacteria	10.0±1.7	10.0±1.3	11.1±0.4
Lactobacilli	9.2±1.4	9.1±2.1	10.1±0.2
Streptococci	8.0±0.9	7.3±0.5	7.1±0.5
Staphylococci	4.6±0.2	4.5±0.5	3.7±0.3 <sup>b</sup>
Enterobacteriaceae	8.4±0.4	8.6±0.5	7.9±0.9
Total viable counts	11.1±0.2	11.1±0.3	11.3±0.3
Ratio of bifidobacteria to total viable counts (%)	32.1±21.4	30.7±25.8	56.2±13

See footnotes of Tables A-13 and A-14.

**Table A-27** Dose effects of laminaran on body, fecal, cecal and liver weight in rats

	Diets containing laminaran			
	Control	0.4%	2.0%	8.0%
Initial body weight (g)	59±3	58±4	58±3	58±2
Body weight gain (g / 7 days)	45±1	46±4	42±3	39±3 <sup>a</sup>
Fecal weight (g / day / 4 rats)	0.20±0.13	0.08±0.06	0.05±0.09	0.36±0.22
Cecal weight (g / 100 g body weight)	1.22±0.41	1.90±0.52	2.91±0.43 <sup>b</sup>	4.30±1.23 <sup>b</sup>
Liver weight (g / 100 g body weight)	5.97±0.33	6.21±0.41	5.68±0.28	5.58±0.28

See footnotes of Table A-21.

**Table A-28** Dose effects of low viscous sodium alginate (AG5) on body, fecal, cecal and liver weight in rats

	Control	Diets containing AG5		
		0.4%	2.0%	10.0%
Initial body weight (g)	66±5	67±3	66±5	63±3
Body weight gain (g / 7 days)	42±4	44±7	44±4	32±3 <sup>a</sup>
Fecal weight (g / day / 4 rats)	0.18±0.04	0.24±0.14	0.32±0.12	3.24±0.24 <sup>b</sup>
Cecal weight (g / 100 g body weight)	1.71±0.32	2.77±0.93	3.85±0.24 <sup>b</sup>	4.49±0.97 <sup>b</sup>
Liver weight (g / 100 g body weight)	5.73±0.11	5.67±0.17	5.36±0.11 <sup>b</sup>	4.59±0.25 <sup>b</sup>

See footnotes of Table A-21.

**Table A-29** Dose effects of laminaran on the cecal pH, cecal ammonia and levels of serum lipid in rats

	Control	Diets containing laminaran		
		0.4%	2.0%	8.0%
Cecal pH	6.83±0.28	5.81±0.46 <sup>a</sup>	5.28±0.50 <sup>b</sup>	5.45±0.45 <sup>b</sup>
Cecal ammonia (μg / g)	907±97	1036±196	882±93	561±97 <sup>b</sup>
Plasma TG (mg / 100 ml)	282±73	203±35	192±31	105±33 <sup>b</sup>
Plasma TC (mg / 100 ml)	102±7	98±3	97±13	99±13
Plasma HDL (% of TC)	65±4	61±8	63±11	84±4 <sup>a</sup>
Plasma NEFA (μEq / l)	657±188	657±252	1009±413	967±286

See footnotes of Table A-23.

**Table A-30** Dose effects of low viscous sodium alginate (AG5) on the cecal pH, cecal ammonia and levels of serum lipid in rats

	Control	Diets containing AG5		
		0.4%	2.0%	10.0%
Cecal pH	6.73±0.20	6.69±0.33	5.89±0.49 <sup>a</sup>	6.17±0.24 <sup>a</sup>
Cecal ammonia (μg / g)	949±96	1045±49	927±78	866±89
Plasma TG (mg / 100 ml)	307±30	202±18 <sup>b</sup>	202±65 <sup>a</sup>	99±32 <sup>b</sup>
Plasma TC (mg / 100 ml)	96±2	78±18	76±12 <sup>a</sup>	80±6 <sup>b</sup>
Plasma HDL (% of TC)	65±6	76±4 <sup>a</sup>	57±4	49±1 <sup>b</sup>
Plasma NEFA (μEq / l)	675±87	744±103	665±113	416±244

See footnotes of Table A-23.



**Table A-31** Dose effect of laminaran on cecal microflora in rats

Organisms	Control	Diets containing laminaran		
		0.4%	2.0%	8.0%
Bacteroidaceae	10.6±0.2	10.6±0.6	10.9±0.2	10.8±0.4
Eubacteria	9.1±0.5	8.5±1.6	7.8±1.2	8.4±1.2
Peptococcaceae	9.0±1.2	8.4±1.6	9.1±0.9	9.8±0.3
Bifidobacteria	9.6±1.2	10.6±0.7	10.6±0.5	10.1±0.4
Lactobacilli	10.0±0.2	9.6±0.4	9.9±0.3	10.2±0.4
Streptococci	8.4±0.9	8.4±0.8	8.6±0.0	9.5±0.6
Staphylococci	3.9±0.1	4.2±0.4	3.3(1)	3.6±0.3
Enterobacteriaceae	9.4±0.5	9.5±1.0	9.4±0.3	10.3±0.2 <sup>a</sup>
Total viable counts	11.0±0.2	11.1±0.2	11.2±0.2	11.3±0.3
Ratio of bifidobacteria to total viable counts (%)	17.4±19.1	45.8±31.9	29.9±26.4	13.5±10.1

See footnotes of Tables A-13 and A-14.

**Table A-32** Dose effect of low viscous sodium alginate (AG5) on cecal microflora in rats

Organisms	Control	Diets containing AG5		
		0.4%	2.0%	10.0%
Bacteroidaceae	10.4±0.2	10.1±0.6	10.3±0.2	10.4±0.4
Eubacteria	8.5±1.6	8.7±1.9	9.1±1.4	9.9±0.5
Peptococcaceae	9.1±0.6	9.7±0.5	7.9±1.1	9.5±0.3
Bifidobacteria	9.3±1.1	10.1±0.1	10.0±0.1	9.8±0.4
Lactobacilli	8.3±2.2	9.8±0.2	9.4±0.5	9.5±0.2
Streptococci	8.7±0.5	8.8±0.3	7.9±0.5	9.2±0.3
Staphylococci	4.3±0.1	3.6±0.3 <sup>a</sup>	3.9±0.7	4.3±0.3
Enterobacteriaceae	9.6±0.2	9.5±0.6	9.5±0.3	9.3±0.2
Total viable counts	10.8±0.3	10.8±0.3	10.8±0.1	10.7±0.1
Ratio of bifidobacteria to total viable counts (%)	10.8±12.4	23.9±13.3	18.6±4.1	16.2±12.5

See footnotes of Tables A-13 and A-14.

## 第 4 章に関するデータ

**Table A-33** Effects of polysaccharides of arame on body, fecal, cecal and liver weight in rats

	Control	5% arame	0.75% F1	2.2% F2	1.5% F3
Initial body weight (g)	66±2	65±3	65±1	64±2	65±3
Body weight gain (g / 7 days)	41±3	46±2	43±1	47±4	37±8
Fecal weight (g / day / 4 rats)	0.71±0.25	4.98±0.75 <sup>b</sup>	1.04±0.18	1.86±0.30 <sup>b</sup>	1.38±0.39 <sup>a</sup>
Cecal weight (g / 100 g body weight)	0.94±0.12	2.00±0.11 <sup>b</sup>	1.42±0.15 <sup>b</sup>	1.37±0.21 <sup>a</sup>	0.94±0.09
Liver weight (g / 100 g body weight)	5.79±0.32	5.77±0.38	6.09±0.23	5.40±0.32	5.17±0.20 <sup>a</sup>

See footnotes of Table A-1.

F1; 0.1 N HCl extract, F2; 1% NaCO<sub>3</sub> extract, F3; insoluble contents.**Table A-34** Effects of polysaccharides of arame on the cecal pH, cecal ammonia and levels of serum lipid in rats

	Control	5% arame	0.75% F1	2.2% F2	1.5% F3
Cecal pH	7.44±0.16	7.48±0.05	6.90±0.24 <sup>a</sup>	7.53±0.14	7.47±0.09
Cecal ammonia (μg / g)	820±384	238±90 <sup>a</sup>	1067±82	454±93	782±159
Plasma TG (mg / 100 ml)	191±12	151±19 <sup>a</sup>	136±31 <sup>a</sup>	165±26	118±17 <sup>b</sup>
Plasma TC (mg / 100 ml)	89±46	59±3	60±11	84±20	58±9
Plasma NEFA (μEq / l)	616±63	649±39	690±149	759±146	525±77

See footnotes of Tables A-7 and A-33.

**Table A-35** Effect of arame methanolic extract on weights of body, feces, cecum and liver in rats

	Control	Arame MeOH extract
Initial body weight (g)	63±3	64±3
Body weight gain (g/7 days)	44±2	46±3
Fecal weight (g/day/4 rats)	0.50±0.50	0.54±0.10
Cecal weight (g/100g body weight)	1.40±0.34	1.71±0.25
Liver weight (g/100g body weight)	5.72±0.22	5.51±0.06

See footnote of Table A-1.

**Table A-36** Effect of arame methanolic extract on cecal pH, cecal ammonia and plasma lipid in rats

	Control	Arame MeOH extract
Cecal pH	6.73±0.23	6.61±0.41
Cecal ammonia (μg/g)	560±100	530±195
Plasma TG (mg/100ml)	217±65	124±11 <sup>a</sup>
Plasma TC (mg/100ml)	117±16	130±18

See footnote of Table A-7.



**Table A-37** Effects of polysaccharides in *arame* on cecal microflora in rats

Organisms	Control	5% <i>arame</i>	0.75% F1	2.2% F2	1.5% F3
Bacteroidaceae	8.9±0.4	10.2±0.4 <sup>b</sup>	10.0±0.4 <sup>a</sup>	9.8±0.4 <sup>a</sup>	9.6±0.1 <sup>a</sup>
Eubacteria	8.6±0.4	8.5±1.1	9.3±0.4	9.7±0.7	9.2±0.1
Peptococcaceae	8.1±0.7	8.9±0.6	9.7±0.7 <sup>a</sup>	9.1±0.7	9.2±1.1
Bifidobacteria	8.2±0.5	7.9±1.0	9.8±0.7 <sup>a</sup>	9.6±0.6 <sup>a</sup>	9.3±0.3 <sup>a</sup>
Lactobacilli	8.5±0.4	6.8±0.8 <sup>a</sup>	9.4±0.4 <sup>a</sup>	8.8±1.0	9.1±0.2
Streptococci	7.2±0.3	6.5±0.3	6.3±0.3	6.4±1.0	6.7±0.2
Staphylococci	4.3±0.5	3.8±0.3	4.0±0.5	4.1±0.2	4.4±0.5
Enterobacteriaceae	7.8±0.5	8.8±0.4 <sup>a</sup>	8.4±0.5 <sup>a</sup>	6.8±0.9	6.8±0.4
Total viable counts	9.3±0.3	10.4±0.4 <sup>b</sup>	10.5±0.4 <sup>b</sup>	10.2±0.4 <sup>a</sup>	10.1±0.2 <sup>b</sup>
Ratio of bifidobacteria to total viable counts (%)	8.6±6.6	2.8±5.2	24.6±20.4	24.6±9.3	15.6±4.2

See footnotes of Tables A-13, 14 and A-33.

**Table A-38** Effect of *arame* methanolic extract on cecal microflora in rats

	Control	<i>Arame</i> MeOH extract
Bacteroidaceae	10.1±0.3	10.2±0.4
Eubacteria	8.7±1.1	8.9±0.1
Peptococcaceae	8.9±1.2	8.2±1.4
Bifidobacteria	9.9±0.6	8.2±1.1
Lactobacilli	9.2±0.2	8.2±1.3
Streptococci	8.2±0.8	8.2±0.3
Enterobacteriaceae	8.8±0.4	8.9±0.3
Total	10.6±0.2	10.4±0.4
Ratio of bifidobacteria to total viable counts (%)	33.0±23	2.9±4.3

See footnote of Table A-13.